

## ACTIVITE TRYPSIQUE A L'EGARD DE CERTAINS SUBSTRATS CHROMOGENES

Y. JACQUOT-ARMAND et M. HILL

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

Received 30 September 1970

Tryptic hydrolysis of different arginine nitroanilides was studied. Para-nitroanilide is the most readily hydrolyzed substrate, ortho derivative is 5 times less sensitive and meta derivative is a very weak substrate. When the benzoyl group bound on the  $N^{\alpha}$  arginine of BAPNA is replaced by a carbobenzoxy group (L-ZAPNA), the tryptic hydrolysis is increased by a factor of 3. With this latter substrate, the kinetic constants are determined for two forms, native and  $N^{\epsilon}$ -acetylated of porcine and bovine trypsin. Evidence is presented that the rate of hydrolysis is both related to the global and local charges of the enzyme.

## 1. Introduction

Pour étudier l'action de différents inhibiteurs sur la trypsine [1] et suivre l'activité du complexe que forme cet enzyme avec l' $\alpha_2$  macro globuline [2], nous avons utilisé comme substrat le BAPNA\*. Lorsqu'on a remplacé la trypsine native par une forme acétylée (Tac), on a observé une forte augmentation de la vitesse d'hydrolyse de ce substrat [2]. Ce phénomène d'activation n'a pas été retrouvé avec d'autres substrats synthétiques esters (BAEE, TSAME) ou amides

(BAA, BANA) par les chercheurs qui ont mis au point la préparation de la trypsine  $N^{\epsilon}$ -acétylée [3], ni par nous-mêmes ensuite.

Ce substrat BAPNA doit sa sensibilité à la fonction nitro anilide qui, d'après Erlanger [4], faciliterait l'hydrolyse trypsique en raison du pouvoir fortement attracteur d'électrons du groupe  $N^{\epsilon} \equiv O$ .

Il nous a paru intéressant de chercher à préciser le rôle de ce groupe nitré dans l'activation en modifiant sa position sur le noyau anilide (para, ortho ou meta). Nous avons donc synthétisé ces substrats et comparé leur sensibilité à l'hydrolyse.

Par ailleurs nous avons substitué le groupe carbobenzoxy au groupe benzoyl fixé sur le  $N^{\alpha}$  de l'arginine dans la synthèse de ces nitroanilides. Les nouveaux substrats, de structure analogue aux précédents, présentent l'avantage de ne pas se racémiser au cours de la préparation. On a ainsi isolé le  $N^{\alpha}$ -carbobenzoxy-L-arginine-*p* (ou *m*)-nitroanilide et il a été possible de déterminer directement les constantes d'hydrolyse du L-ZAPNA alors que, dans le cas du DL-BAPNA, on devait tenir compte de la présence de la forme D inhibitrice de la réaction.

Pour toutes ces études nous avons comparé des trypsines d'espèce porcine ou bovine, cette dernière sous forme native ou acétylée sur ses 14 résidus lysines. On sait en effet que ces trypsines présentent des propriétés électrostatiques différentes.

## Abréviations:

- BAPNA:  $N^{\alpha}$ -benzoyl-DL-arginine-*p*-nitroanilide;  
 BAONA:  $N^{\alpha}$ -benzoyl-DL-arginine-*o*-nitroanilide;  
 BAMNA:  $N^{\alpha}$ -benzoyl-DL-arginine-*m*-nitroanilide;  
 ZAPNA:  $N^{\alpha}$ -carbobenzoxy-L-arginine-*p*-nitroanilide;  
 ZAMNA:  $N^{\alpha}$ -carbobenzoxy-L-arginine-*m*-nitroanilide;  
 BAEE:  $N^{\alpha}$ -benzoyl-L-arginine ethyl ester;  
 TSAME:  $N^{\alpha}$ -toluène sulfonyl-L-arginine methyl ester;  
 BAA:  $N^{\alpha}$ -benzoyl-L-arginine amide;  
 BANA:  $N^{\alpha}$ -benzoyl-DL-arginine- $\beta$ -naphthylamide;  
 Tac: trypsine- $N^{\epsilon}$ -acétylée.

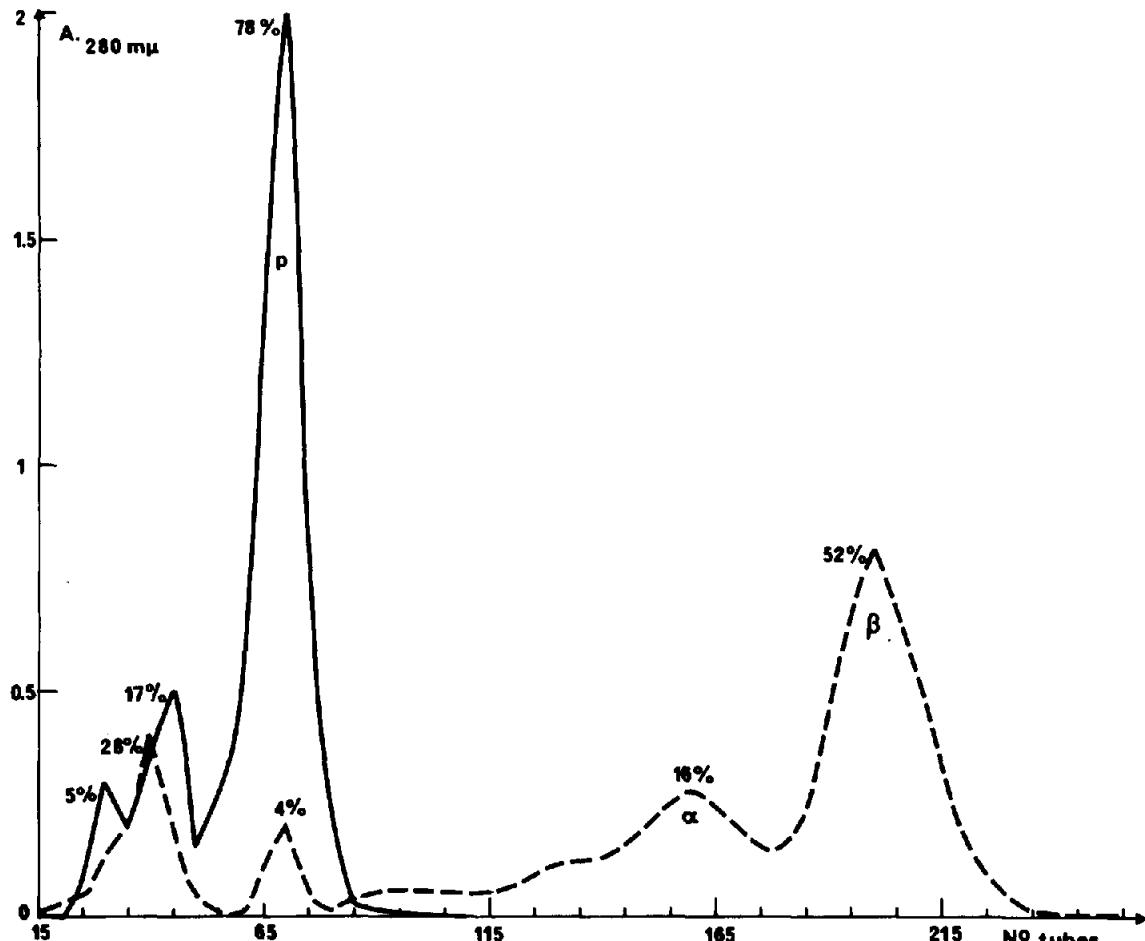


Fig. 1. Chromatographie de la trypsine sur SE-Sephadex (colonne, 2, 2 X 85 cm) tampon tris-HCl pH 7,1 à 4°, débit = 16 ml/h; 8 ml collectés par tube, trypsine bovine Novo 250 mg -----; trypsine porcine Choay 250 mg ——.

## 2. Matériaux et méthodes

**Enzymes.** La  $\beta$ -trypsine est obtenue par chromatographie de la trypsine bovine (Novo) en suivant rigoureusement la méthode de Schroeder et Shaw [5].

La  $p$ -trypsine est la fraction active principale isolée d'une trypsine porcine (Choay) par cette même technique chromatographique. On observe un diagramme d'élution de la colonne très différent du précédent: la fraction active est ici élue par un volume de solution tampon 3 fois moins important que la trypsine bovine (fig. 1).

La  $N^{\epsilon}$ -acétyl-trypsine (Tac) est préparée à partir de la trypsine bovine Novo en suivant la technique d'acétylation ménagée décrite par Labouesse [3].

La concentration protéique est mesurée par spectrophotométrie, à 280 nm en prenant  $E_{\text{cm}}^{\text{cm}} = 16,1$  pour les trypsines bovines et  $E_{\text{cm}}^{\text{cm}} = 14,3$  pour la trypsine porcine; ces coefficients d'extinction ont été déterminés par microdosages d'azote et mesure de poids secs.

**Substrats.** Le DL-BAPNA est un produit commercial (Fluka).

Les autres substrats ont été synthétisés par l'un de nous au laboratoire:

Le DL-BAONA et le DL-BAMNA sont obtenus en suivant la technique décrite par Erlanger [4] pour le DL-BAPNA. On benzoyle d'abord la L arginine puis on fixe la nitroaniline sur la  $N^{\alpha}$ -benzoyl-L-arginine, ce qui provoque toujours la racémisation du produit final.

Tableau 1  
Vitesse d'hydrolyse trypsique de diverses nitroanilides.  $T = 25^\circ$  pH = 8,2.

Trypsine (mM)	DL-BAPNA	DL-BAONA	DL-BAMNA	L-ZAPNA	L-ZAMNA
$\beta$					
0,434	0,135	0,025	0,010	0,475	0,013
3,63	—	0,360	0,075	—	0,145
Tac					
0,434	0,363	0,040	0,012	1,270	0,015
3,63	—	0,440	0,115	—	0,170

Le substrat est purifié sur colonne d'alumine neutre en éluant par de l'alcool à 95°:

DL-BAONA  $Rdt = 65\%$   $F = 190^\circ$  (alcool 95°)

DL-BAMNA  $Rdt = 80\%$   $F = 231^\circ$  (eau)

Analyse pour:

$C_{19}H_{23}N_6O_4Cl$  calc. %:

C = 52,5; H = 5,3; N = 19,5

BAONA tr. %:

C = 52,36; H = 5,26; N = 19,26

BAMNA tr. %:

C = 52,36; H = 5,35; N = 18,63

Le L-ZAPNA et le L-ZAMNA sont obtenus par la méthode à l'anhydride mixte: un mélange de 4 g de chlorhydrate de  $N^\alpha$ -carbobenzoxyl-L-arginine [6] et de 1,16 g de triéthylamine est dissout dans 31 ml de *N,N*-diméthylformamide, puis est refroidi à  $-10^\circ$ . On introduit en agitant 1,58 g de chloroformate d'isobutyle et, après 25 min, on ajoute lentement 1,6 g de *p*(ou *m*)-nitroaniline en solution dans 15 ml de DMF. L'agitation est maintenue une nuit avec retour à la température ambiante. On élimine le précipité de chlorhydrate de triéthylamine par filtration et la solution est évaporée sous vide. L'huile résiduelle est lavée à l'éther puis à l'acétone. Le substrat est, comme précédemment, purifié par chromatographie sur colonne d'alumine:

L-ZAPNA  $Rdt = 30\%$

$F = 180^\circ$  (eau-HCl, 1/1)  $[\alpha]_D^{24} = -12,26$

L-ZAMNA  $Rdt = 54\%$

$F = 197^\circ$ , 5 (alcool 95°)\*  $[\alpha]_D^{24} = -18,7$

\* Littérature:  $F = 196 - 197^\circ$  [7].

Le ZAPNA a le même spectre que le BAPNA avec un maximum d'absorbance à 315 nm.

Analyse pour:

$C_{20}H_{25}N_6O_5Cl$  calc. %:

C = 51,66; H = 5,38; N = 18,08; Cl = 7,64

ZAPNA tr. %:

C = 51,62; H = 5,53; N = 18,24; Cl = 7,75

ZAMNA tr. %:

C = 51,94; H = 5,33; N = 18,44; Cl = 7,75

La pureté de ces substrats est vérifiée par chromatographie en couche mince et spectroscopie infra-rouge.

La vitesse initiale d'hydrolyse du substrat par l'enzyme est mesurée dans tous les cas en suivant par spectrophotométrie (Cary 15) la cinétique d'apparition de la nitroaniline à 410 nm. La solution aqueuse de substrat ( $3 \times 10^{-3}$  M) est d'abord mélangée dans la cuve de mesure (thermostatée à  $25^\circ$ ) avec la solution tampon tris-HCl 0,05 M pH 8,2. On ajoute l'enzyme sous un faible volume et on suit variation d'absorbance en fonction du temps. La vitesse d'hydrolyse par minute est calculée en utilisant la portion linéaire de l'enregistrement.

Pour déterminer les constantes catalytiques on fait varier la concentration du substrats dans la cuve ( $10^{-4}$  M à  $10^{-2}$  M) et on mesure, pour un même apport d'enzyme, la vitesse d'hydrolyse correspondant à chaque concentration de substrat en jeu. La représentation adoptée est celle de Lineweaver et Burk. On en déduit les valeurs de  $K_m$ ,  $V_m$  et  $k_{cat}$ .

### 3. Résultats

L'activité hydrolytique à l'égard des substrats nitro-

Tableau 2  
Valeur des constantes d'hydrolyse du L-ZAPNA.  $T = 25^\circ$   
 $\text{pH} = 8,2$

Trypsine	$\beta$ (bovine)	$p$ (bovine)	Tac (bovine)
$K_m \times 10^3 \text{ M}$	0,454	0,333	0,530
$k_{\text{cat}} \text{ sec}^{-1}$	3,6	4,8	11,0

anilides précédemment décrits a été mesurée pour les deux formes de trypsine bovine ( $\beta$  et  $N^\epsilon$ -acétylée). Comme il ressort du tableau 1, le substrat le plus favorable à l'hydrolyse est celui qui possède le groupe nitré en position para sur la fonction anilide. Par rapport au BAPNA pris comme unité, les valeurs relatives de sensibilité à l'hydrolyse seraient 0,2 pour BAONA et  $< 0,1$  pour BAMNA. Lorsque le carbobenzoxo remplace le benzoyl sur le  $N^\alpha$  de l'arginine du substrat, on constate une nette augmentation de l'activité trypsique; ici encore la position du  $\text{NO}_2$  en para sur l'anilide est la plus favorable à l'hydrolyse.

Le L-ZAMNA est très faiblement hydrolysé. Pour obtenir des vitesses mesurables, nous avons dû augmenter fortement la concentration de l'enzyme et nous placer dans les conditions décrites par les chercheurs russes [7] qui utilisent ce substrat (3,6 mM). Lorsqu'on compare l'activité de la trypsine native et  $N^\epsilon$ -acétylée avec ces diverses nitroanilides, on observe toujours pour Tac un phénomène d'activation. Cet effet est optimum lorsque le substrat est sous forme  $p$ -nitroanilide (tableau 1).

En utilisant le substrat le plus sensible à l'hydrolyse trypsique, le L-ZAPNA, nous avons déterminé les constantes cinétiques en comparant les trypsines:  $\beta$ -bovine,  $p$ -porcine et  $N^\epsilon$ -acétylée-bovine. Les résultats rapportés dans le tableau 2 montrent que l'affinité à l'égard de ce substrat est du même ordre de grandeur pour ces 3 enzymes. Ce qui les différencie est la vitesse maximale d'hydrolyse: la valeur du  $k_{\text{cat}}$  semble dépendre de la charge globale de l'enzyme. La valeur la plus élevée est obtenue pour Tac dont la charge est très affaiblie par suite de l'acétylation des 14 résidus lysine de la molécule initiale (le point isoelectrique passe de 10,5 pour la trypsine native à 5,1 pour Tac).

Par ailleurs la trypsine porcine a un  $k_{\text{cat}}$  légèrement plus grand que la  $\beta$ -bovine alors que la charge globale est moins élevée, comme nous l'avons vérifié

par électrophorèse en gel d'acrylamide à pH 4,9 (la mobilité de  $\beta$  est 1,5 fois moindre que celle de  $\beta$ ).

La forte activation observée précédemment pour l'hydrolyse du BAPNA par la trypsine  $N^\epsilon$ -acétylée [2], se retrouve donc avec un substrat analogue, le L-ZAPNA. Nous n'avons jamais obtenu ce phénomène d'activation avec d'autres substrats amides non nitrés.

#### 4. Discussion

Nos résultats mettent en évidence un plus grande sensibilité des substrats nitroanilides lorsque le groupe nitré est situé en position para. Il est établi que les groupements attracteurs d'électrons favorisent l'hydrolyse basique des anilides [8], on pouvait donc s'attendre à des résultats similaires dans l'étude de l'hydrolyse trypsique de substrats nitroanilides. Si l'on considère la structure du  $N^\alpha$ -benzoyl-DL-arginine- $p$ -nitroanilide, on constate que l'effet mésomère accepteur du  $\text{NO}_2$  produit une délocalisation des électrons  $\pi$  du noyau, ce qui se traduit par l'apparition de charges  $\delta^+$  en ortho ou para du  $\text{NO}_2$  (cette dernière position étant favorable); de ce fait le doublet de l'azote est sollicité, la liaison amidique se trouve affaiblie et l'hydrolyse est facilitée (fig. 2, schéma I). Avec l'*o*-nitroanilide, la coupure de la liaison amidique est également favorisée mais à un degré moindre par suite d'une chélation possible (fig. 2, schéma II) et cette structure est moins résonnante que la précédente. Avec le *m*-nitroanilide, par contre, il n'y a aucune charge  $\delta^+$  induite sur le carbone lié à l'azote amidique, ce qui explique la mauvaise activité du substrat BAMNA.

Le mécanisme d'hydrolyse des  $N^\alpha$ -carbobenzoxyl-L-arginine *p*- et *m*-nitroanilides se ferait d'après le même schéma. Cependant il est intéressant de noter que la vitesse d'hydrolyse du ZAPNA est exaltée par rapport au BAPNA. On peut penser qu'en fixant un groupe intermédiaire entre le noyau benzoyl et l'arginine, on facilite l'accès au site de fixation de l'enzyme. Certains auteurs ont signalé l'effet favorable du groupe carbobenzoxyl fixé sur le  $N^\alpha$  de l'arginine dans le cas de substrats trypsiques du type naphtylamide [9].

Par ailleurs, pour expliquer l'effet d'activation observé avec la trypsine  $N^\epsilon$ -acétylée à l'égard des substrats nitroanilides, on peut envisager, comme nous l'avons mentionné, l'influence de la charge globale de l'enzyme, mais il semble plus intéressant de faire appel à un effet de charge locale en s'appuyant sur

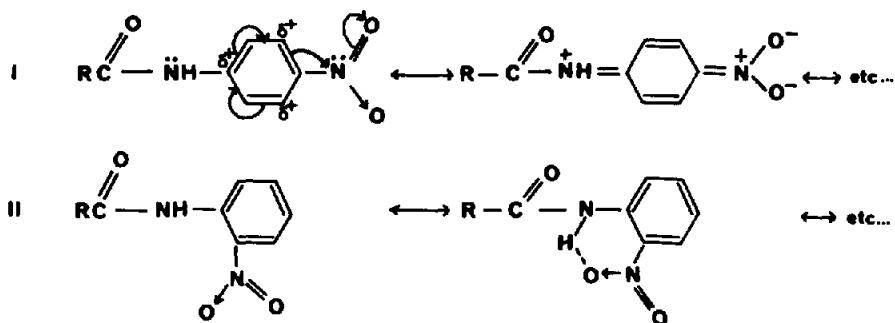


Fig. 2. I *p*-nitroanilide: structure mésomère; II *o*-nitroanilide: forme chelatée.

les récents travaux de Walsh et Hartley\*. Ces auteurs ont montré que le résidu 177 de la trypsine est réellement un acide aspartique et non une asparagine comme on le pensait jusqu'alors. Le site de fixation du substrat ferait donc intervenir l'acide aspartique 177 de la trypsine. La lysine 176 ayant perdu par acétylation la charge + du groupe  $\epsilon$  N, il est possible d'imaginer une modification d'interactions entre le COO<sup>-</sup> du résidu 177 et la charge  $\delta^+$  induite sur le substrat nitroanilide.

#### Remerciements

Ce travail, poursuivi dans le laboratoire du Professeur J. Tonnelat, a bénéficié de l'aide de la DGRST (Convention no 6700580). Nous tenons à remercier Mademoiselle S. Guinand pour ses suggestions intéressantes.

\* Intern. Symp. on Structure, Function Relationships of Proteolytic Enzymes, Copenhagen (June 1969).

#### Bibliographie

- [1] Y. Jacquot-Armand et G. Krebs, FEBS Letters 4 (1969) 21.
- [2] Y. Jacquot-Armand et G. Krebs, Biochem. Biophys. Res. Commun. 36 (1969) 815.
- [3] J. Labouesse et M. Gervais, European J. Biochem. 2 (1967) 215.
- [4] B.F. Erlanger, N. Kokowsky et W. Cohen, Arch. Biochem. Biophys. 95 (1961) 271.
- [5] D.D. Schroeder et E. Shaw, J. Biol. Chem. 243 (1968) 2943.
- [6] F.P. Goldstein, R.E. Paplinger, M.N. Nachlas et A.M. Seligman, J. Med. Pharm. Chem. 5 (1962) 852.
- [7] S.E. Bresler, G.P. Valasov et V.M. Krutyakov, Mol. Biol. 3 (1969) 15 (en russe).
- [8] I. Meloche et K.J. Laidler, J. Am. Chem. Soc., 73 (1951) 1712.
- [9] G.G. Gleiner, V.K. Hopsu et L.A. Cohen, J. Histochem. Cytochem., 12 (1964) 545.