

**LOCALISATION DANS LA CHAINE PEPTIDIQUE  
DE LA  $\beta$  LACTOGLOBULINE BOVINE  
DE LA SUBSTITUTION Glu/Gln DIFFERENCIANT LES VARIANTS  
GENETIQUES B ET D**

Ghislaine BRIGNON et B. Ribadeau DUMAS

*Laboratoire de Recherches sur les Protéines, INRA, CNRZ,  
78350 Jouy en Josas, France*

Received 12 March 1973

It is definitively shown that the D variant of bovine  $\beta$ -lactoglobulin D differs from the B variant in having a substitution Gln  $\rightarrow$  Glu which involves residue 45 in the complete sequence recently published by Braunitzer et al. [4].

## 1. Introduction

L'électrophorèse sur papier ou en gel a permis de détecter jusqu'à présent 4 variants génétiques de la  $\beta$  lactoglobuline bovine, les variants A, B, C et D [1-3].

Les deux substitutions d'amino-acides qui diffèrent les variants A et B ont été définitivement localisées dans la chaîne polypeptidique de la protéine, dont la séquence vient d'être entièrement élucidée par Braunitzer et al. [4] (substitutions 64 Asp (A)  $\rightarrow$  Gly (B) et 118 Val (A)  $\rightarrow$  Ala (B)).

Par contre, la substitution Gln (B)  $\rightarrow$  His (C) qui différencie les variants B et C [5] ainsi que la substitution Glu (B)  $\rightarrow$  Gln (D) qui différencie les variants B et D n'ont pas été exactement localisées jusqu'ici.

En nous basant sur la séquence partielle qui avait été publiée par Frank et Braunitzer [7], nous avions suggéré que la substitution Glu  $\rightarrow$  Gln différenciant les variants B et D affectait le 109ème résidu de la chaîne peptidique de la  $\beta$  lactoglobuline [6]. Cependant la séquence complète qui vient d'être établie par la même équipe [4] est très différente de la séquence partielle antérieurement proposée, ce qui nous a incité à ré-examiner le cas du variant D de la  $\beta$  lactoglobuline ( $\beta$ lg).

En suivant une méthode différente de celle que nous avions adoptée dans notre premier travail [6] nous

avons pu vérifier que les variants  $\beta$ lg B et  $\beta$ lg D différaient bien par une substitution Glu (B)  $\rightarrow$  Gln (D). Mais il est clair désormais que cette substitution affecte le 45ème résidu de la chaîne peptidique de la  $\beta$  lactoglobuline.

## 2. Materiel et méthodes

La  $\beta$  lactoglobuline D a été préparée par la méthode d'Aschaffenburg et Drewry [8] à partir du lait de la même vache homozygote pour l'allèle  $\beta$ lg D que dans notre étude antérieure [6]. Après réduction à température ordinaire en tampon véronal 0,1 M de pH 8,0 en présence d'urée 8 M et de 2 mercaptoéthanol 0,04 M, la protéine a été alkylée par l'acide iodacétique selon Woychik [9].

Les techniques d'hydrolyse enzymatique, d'électrophorèse et de chromatographie sur papier, de chromatographie sur colonnes de Dowex AG 50 W X 2 ou de Sephadex, ainsi que la méthode dosage des amino-acides à l'aide d'un analyseur Beckman Unichrom équipé pour analyse sur une seule colonne sont celles que nous avons décrites antérieurement [10-12].

L'origine des produits est la suivante: chymotrypsine, Worthington, 3 X cristallisée; thermolysine, Merck, cristallisée 6000 PU/mg; aminopeptidase M, Röhm, 5.000 mU; carboxypeptidase A et leucineaminopeptidase, Worthington, traitées au DFP.

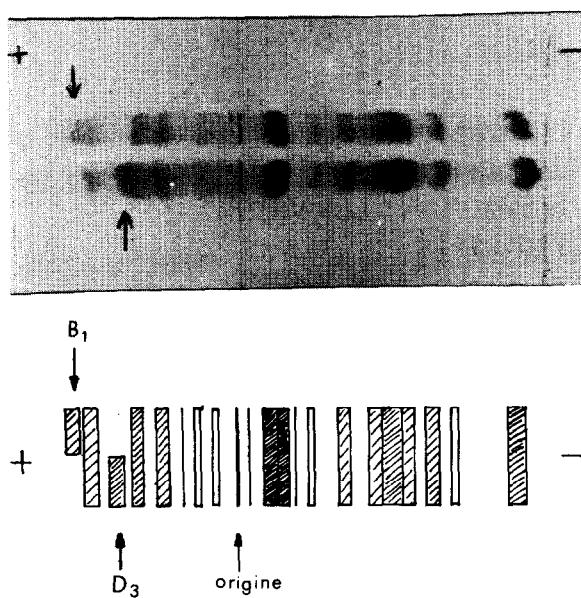


Fig. 1. Electrophorèse haute tension à pH 6,5 des hydrolysats chymotrypsiques des  $\beta$  lactoglobulines B et D S-carboxy-méthylées.

### 3. Résultats

En comparant, par électrophorèse à haute tension sur papier (pH 6,5) des hydrolysats chymotrypsiques des  $\beta$  lactoglobulines B et D, nous avions pu identifier le peptide contenant le site de la substitution différenciant les deux variants ([6] et fig. 1). Ce résultat est tout à fait répétable. La composition globale en amino-acides de ce peptide, préparé par électrophorèse préparative sur papier était identique pour les deux variants Asx, Thr, Glx<sub>4</sub>, Pro<sub>2</sub>, Gly, Val, Ile, Leu<sub>3</sub>, Lys. L'action de la leucine aminopeptidase avait indiqué que la différence de mobilité révélée par électrophorèse

était vraisemblablement due à une substitution Glu/Gln

Pour obtenir en quantité plus importante le peptide chymotrypsique contenant la substitution propre au variant  $\beta$ lg D nous avons effectué cette fois une chromatographie sur Dowex AG50 W X 2 de l'hydrolysat chymotrypsique (rapport molaire E/S = 1/75; 38°C; pH 8,0; durée 3,5 hr). Le peptide recherché a été trouvé dans le 5ème pic du chromatogramme (fig. 2).

Cette fraction contenait en fait deux peptides que nous avons séparés sur colonne de Sephadex G-25 (Ø 2 cm - l. 100 cm) en acide acétique 30 vol %. Le peptide de plus forte masse moléculaire a la composition suivante:

$\beta$ lgD C<sub>5</sub>A: Asx, Thr, Glx<sub>4</sub>, Pro<sub>2</sub>, Gly, Val, Ile, Leu<sub>3</sub>, Lys.

La leucine aminopeptidase libère de ce peptide quatre résidus indiquant la séquence NH<sub>2</sub>-terminale partielle Val-(Glu, Gln, Leu) et la carboxypeptidase A donne la séquence COOH-terminale Ile-Leu (tableau 1). Ce peptide correspond donc au segment 43-57 de la séquence de Braunitzer et al. [4]; il est identique à celui que nous avions isolé précédemment [6].

Ce peptide a été hydrolysé par la thermolysine (rapport molaire E/S = 1/3000; 38°C; pH 8,6; durée 2 hr.) et l'hydrolysat obtenu fractionné par chromatographie et électrophorèse préparatives sur papier. Nous avons ainsi obtenu quatre peptides purs ayant la composition suivante:

$\beta$ lgD C<sub>5</sub>A Th<sub>1</sub>: Glx<sub>2</sub>, Val  
 $\beta$ lgD C<sub>5</sub>A Th<sub>2</sub>: Asx, Thr, Glx, Pro<sub>2</sub>, Gly, Leu, Lys  
 $\beta$ lgD C<sub>5</sub>A Th<sub>3</sub>: Glx, Leu  
 $\beta$ lgD C<sub>5</sub>A Th<sub>4</sub>: Ile, Leu

L'action combinée des carboxypeptidase A, aminopeptidase M et leucine aminopeptidase sur les peptides

Tableau 1  
 Étude du peptide chymotrypsique  $\beta$ lgD C<sub>5</sub>A.

Composition en amino-acides	Asx, 1,06 (1); Thr, 0,91 (1); Glx, 4,10 (4); Pro, 1,95 (2); Gly, 1,01 (1); Val, 0,96 (1) Ile, 0,93 (1); Leu, 3,09 (3); Lys, 0,99 (1)
Leucine aminopeptidase	(2 $\mu$ l - 3 hr) Val, 0,46; Gln, 0,25; Glu, 0,25; Leu, 0,28
Carboxypeptidase A	(2 $\mu$ l - 16 hr) Ile, 0,85; Leu, 1,00

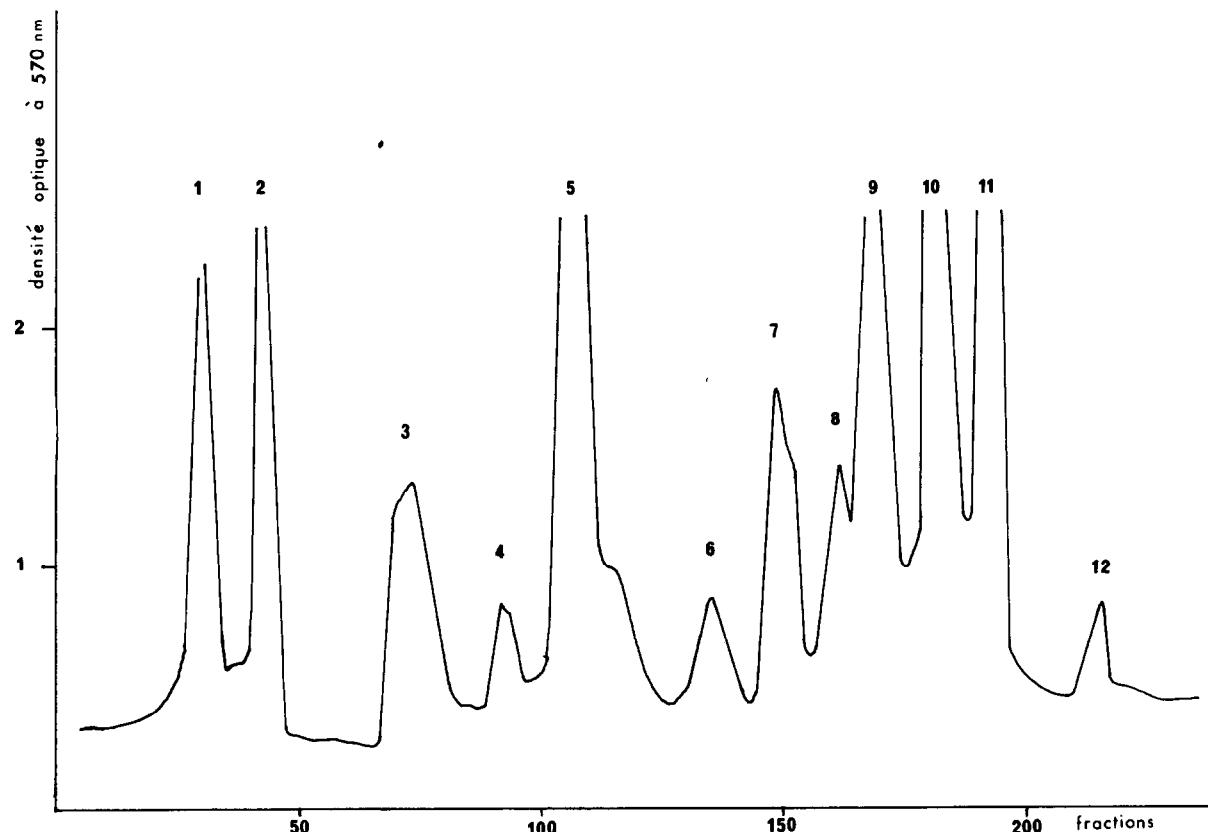
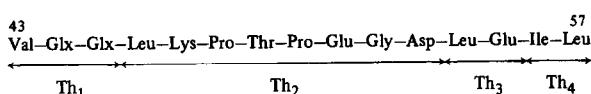


Fig. 2. Diagramme d'élution de l'hydrolysat chymotrypsique de la  $\beta$  lactoglobuline D S-carboxyméthylée. Chromatographie à 40°C, sur colonne de 1 x 100 cm de résine Dowex AG 50 W x 2.200-400 mesh en tampon pyridine-acide acétique-eau. Gradient de pH 3,1 à 5,0, linéaire en normalité de pyridine. Fractions de 3 ml. Débit, 30 ml/hr. Réaction à la ninhydrine après hydrolyse alcaline sur des aliquotes de 200  $\mu$ l.

Th<sub>2</sub> et Th<sub>3</sub> confirme que tous les résidus Glx ou Asx contenus dans ces deux peptides se trouvent sous la forme acide (tableau 2).

En se référant à la séquence de Braunitzer et al. [4] on peut alors écrire la séquence du peptide  $\beta$ lgD C<sub>5</sub>A comme suit:



La substitution caractérisant le variant  $\beta$ lgD ne peut se situer que dans la partie NH<sub>2</sub>-terminale de ce peptide c'est à dire dans le peptide C<sub>5</sub>A Th<sub>1</sub>.

Une action ménagée de la leucineaminopeptidase libère de ce peptide uniquement de la valine, alors,

qu'une action plus intense en libère les 3 aminoacides Val, Glu et Gln. La carboxypeptidase A libère un seul résidu glutaminyle (tableau 2).

D'après cet ensemble de résultats, la séquence du peptide C<sub>5</sub>A Th<sub>1</sub> ne peut être que la suivante:



La substitution Glu  $\rightarrow$  Gln affecte donc la 45ème position de la séquence de la  $\beta$  lactoglobuline. Elle peut n'être due qu'à la mutation d'une seule base du codon correspondant

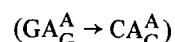


Tableau 2  
Étude des peptides thermolysines  $\beta\text{lgD C}_5\text{A Th}$ .

$\beta\text{lgD C}_5\text{A Th}_1$	
Composition en amino-acides	Glx, 2,05 (2); Val, 0,95 (1).
Séquence	Val-Glu-Gln
Leucineaminopeptidase	(2 $\mu\text{l}$ - 2 hr) Val, 0,35. (5 $\mu\text{l}$ - 24 hr) Gln, 0,97; Glu, 1,01; Val, 0,99.
Carboxypeptidase A	(4 $\mu\text{l}$ - 18 hr) Gln, 0,66.
$\beta\text{lgD C}_5\text{A Th}_2$	
Composition en amino-acides	Asx, 0,92 (1); Thr, 0,83 (1); Glx, 1,08 (1); Pro, 1,77 (2); Gly, 1,10 (1); Leu, 0,98 (1); Lys, 0,91 (1).
Aminopeptidase M	(200 $\mu\text{l}$ à 1 mg/ml - 24 hr) Asp, 0,78; Thr, 0,84; Glu, 0,92; Pro, 1,99; Gly, 0,85; Leu, 1,100; Lys, 0,96.
$\beta\text{lgD C}_5\text{A Th}_3$	
Composition en amino-acides	Glx, 1,13 (1); Leu, 0,87 (1).
Leucineaminopeptidase	(5 $\mu\text{l}$ - 24 hr) Glu, 1,01; Leu, 1,00.
$\beta\text{lgD C}_5\text{A Th}_4$	
Composition en amino-acides	Ile, 1,00 (1); Leu, 0,96 (1).

Cette substitution rend parfaitement compte de la différence de mobilité des variants B et D en électrophorèse sur gel: le variant  $\beta\text{lgD}$  migre plus lentement que  $\beta\text{lgD}$  à pH 8,6 mais migre au même niveau à pH 3,0.

## References

- [1] R. Aschaffenburg et J. Drewry, *Nature* 180 (1957) 376.
- [2] K. Bell, *Nature* 195 (1962) 706.
- [3] F. Grosclaude, J. Pujolle, J. Garnier et B. Ribadeau Dumas, *Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys.* 6 (1966) 215.
- [4] G. Braunitzer, R. Chen, B. Chrak et A. Stangl, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 353 (1972) 832.
- [5] K. Bell, H.A. McKenzie et D.C. Shaw, *Biochim. Biophys. Acta* 154 (1968) 284.
- [6] G. Brignon, B. Ribadeau Dumas, J. Garnier, D. Pantaloni, S. Guinand, J.J. Basch et S.N. Timasheff, *Arch. Biochem. Biophys.* 103 (1969) 720.
- [7] G. Frank et G. Braunitzer, *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* 348 (1967) 1691.
- [8] R. Aschaffenburg et J. Drewry, *Biochem. J.* 65 (1957) 273.
- [9] J.H. Woychik, *Arch. Biochem. Biophys.* 109 (1965) 542.
- [10] F. Grosclaude, J.C. Mercier et B. Ribadeau Dumas, *European J. Biochem.* 14 (1970) 98.
- [11] J.C. Mercier, F. Grosclaude et B. Ribadeau Dumas, *European J. Biochem.* 14 (1970) 108.
- [12] B. Ribadeau Dumas, G. Brignon, F. Grosclaude et J.C. Mercier, *European J. Biochem.* 25 (1972) 505.