

LE VARIANT β E ET LE CODE DE PHOSPHORYLATION DES CASÉINES BOVINES

François GROSCLAUDE, Marie-Françoise MAHE et Gian-Franco VOGLINO

Laboratoire de Génétique Biochimique, INRA – 78350 Jouy-en-Josas, France

et

Osservatorio di Genetica Animale, Via Pastrengo 28, 10128 Torino, Italie

Received 27 May 1974

The E variant of bovine β -casein differs from the reference βA^2 variant by the substitution 36 Glu (βA^2) \rightarrow Lys (βE). Seryl residue 35 is phosphorylated in βE as in βA^2 . The variant βE can be compared to the variant βC which also differs from βA^2 by a Glu \rightarrow Lys substitution. However, this substitution then affects the position 37, and, in this case, the seryl residue 35 is not phosphorylated. These observations tend to support the existence of the phosphorylation code of bovine caseins as postulated by Mercier et al. [1].

1. Introduction

Le variant E de la caséine β bovine a été découvert par Voglino dans la race Piedmontaise italienne [2]. Ce variant, dont la fréquence est très faible (0,001 à 0,002 environ), migre, par électrophorèse en gel alcalin, entre les variants βB et βC ; en gel acide, il migre comme le variant βA^1 (et non pas comme le variant βB , ainsi qu'il a été rapporté par Voglino).

Nous avons précédemment identifié les altérations qui différencient les variants A^1 , A^2 , A^3 , B et C de la caséine β bovine [3]. Le travail qui fait l'objet de la présente note visait à caractériser, de la même manière, le variant βE . Il se trouve que l'étude de ce variant apporte un nouvel élément tendant à confirmer l'existence du code de phosphorylation des caséines bovines proposé par Mercier et al. [1].

2. Matériel et méthodes

La caséine βE a été obtenue dans un état de pureté satisfaisant après deux chromatographies sur colonne de DEAE-cellulose [4], à partir de la caséine entière provenant du lait d'une vache de race Piedmontaise

italienne, hétérozygote au locus β -Cn, et de génotype β -Cn A^2/β -Cn E .

Toutes les techniques utilisées dans ce travail ont été décrites précédemment: électrophorèses et chromatographies sur papier, chromatographies sur colonnes de résine Dowex ou de Sephadex, dosage des acides aminés, dosage du phosphore, hydrolyse par la trypsine [5]; hydrolyse par les exopeptidases [6]; par la phosphatase alcaline [7]; par le bromure de cyanogène [8]. Hydrolyse ménagée pour mise en évidence des phospho-aminoacides [1].

Les principes de la nomenclature utilisée pour désigner les peptides ont également déjà été précisés [5].

3. Résultats

Environ 500 mg de caséine βE ont été hydrolysés par le bromure de cyanogène (CNBr), et l'hydrolysât ainsi obtenu, chromatographié sur colonne de Sephadex G-50 en acide formique 70 vol p. 100, en suivant pour l'essentiel, le protocole de Ribadeau-Dumas et al. [9]. Les peptides CNBr ont été repurifiés, soit par chromatographie sur colonne de Sephadex G-25

en milieu acide, soit par électrophorèse ou chromatographie préparative sur papier. La composition en acides aminés et phosphore de ces peptides CNBr est identique à celle des peptides homologues de βA^2 [9], à l'exception de celle du peptide $\beta ECNI$: ce peptide comporte en effet 5 résidus lysyle (valeur observée: 4,72), au lieu de 4 dans le peptide $\beta A^2 CNI$. En contrepartie, les valeurs obtenues pour la sérine, l'acide glutamique et la proline seraient, dans chaque cas, compatibles avec la perte d'un résidu, mais, compte-tenu de la difficulté d'obtenir une bonne composition pour le peptide βCNI [7, 9] les différences observées ne peuvent, à ce stade, être considérées comme concluantes.

Le peptide $\beta ECNI$ a été recoupé par la trypsine (10 μ moles; E/S:1/150; 40°C; 2 heures 30) et l'hydrolysât ainsi obtenu, chromatographié sur colonne de Dowex AG50WX2, en suivant le même protocole que pour $\beta A^2 CNI$ [10]. Les peptides tryptiques de $\beta ECNI$ ont ensuite été repurifiés, soit par chromatographie sur colonne de Sephadex G-25, soit par électrophorèse préparative sur papier. La composition en acides aminés des peptides ainsi purifiés est identique à celle des peptides tryptiques de $\beta A^2 CNI$ à une exception près: le peptide homologue de $\beta A^2 CNI T3$ (identique à $\beta A^2 T3A$) manque, et est remplacé par les deux peptides suivants, issus respectivement de la quatrième et de la sixième fraction de la chromatographie:

$\beta ECNI T4$: Asx, 2,11 [2]; Thr, 0,77 [1]; Glx, 6,68 [7]; Leu, 1,29 [1]; Lys, 0,83 [1]

$\beta ECNI T6$: Ser, 0,73 [1]; Glx, 1,09 [1]; Phe, 1,05 [1]; Lys, 0,97 [1].

L'hydrolyse ménagée du peptide $\beta ECNI T6$ libère de la phosphosérine, identifiable par électrophorèse sur papier. L'ensemble des résultats ainsi obtenus, ainsi que les résultats d'hydrolyse de $\beta ECNI T6$ par les exopeptidases (après déphosphorylation, pour la CPB et la CPA) montrent clairement que $\beta ECNI T6$ et $\beta ECNI T4$ correspondent, dans βE , à l'élément de séquence représenté dans βA^2 par le peptide $CNI T3$, et que βE diffère de βA^2 par la substitution 36 Glu (βA^2) \rightarrow Lys (βE). (fig. 1).

Ce résultat rend parfaitement compte du comportement du variant βE en électrophorèse: à pH 8,6, βE possède, globalement, 2 charges négatives de moins que βA^2 (contre 1 pour βB et 3,5 pour βC): à pH 3,0, il possède une charge positive de plus, et doit donc bien migrer comme βA^1 .

4. Discussion

Les 3 espèces principales de caséine bovine, les caséines α_{s1} , β et κ sont des phosphoprotéines dont la séquence de référence comporte respectivement 8, 5 et 1 résidu phosphoséryle [1, 11, 12]. Mercier et al. [1] ont remarqué que dans les caséines α_{s1} et β , tous les résidus phosphoséryle sauf un (résidu 75 dans α_{s1})

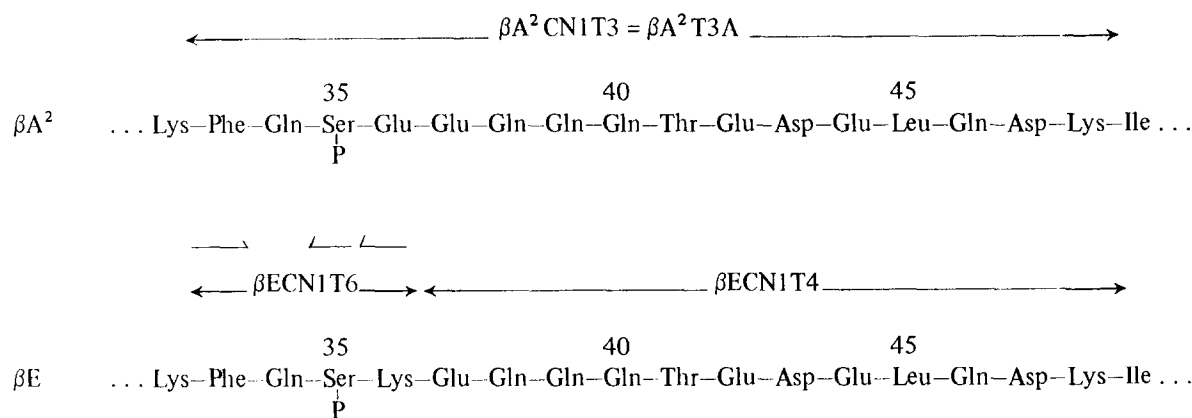


Fig. 1. Localisation, dans la séquence de la caséine β bovine de la substitution 36 Glu \rightarrow Lys qui différencie le variant βE du variant βA^2 . En haut: élément de séquence de βA^2 (résidus 32 à 49); en bas: élément de séquence homologue de βE . —, acide aminé libéré par la leucine aminopeptidase; \longleftrightarrow , acide aminé libéré par les carboxypeptidases A ou B.

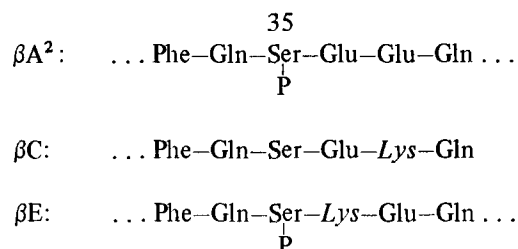


Fig. 2. Eléments de séquence, autour du résidu sérile 35, dans le variant de référence βA^2 et dans les variants βC et βE . La substitution Glu \rightarrow Lys s'accompagne de la disparition du groupement phosphate du résidu sérile 35 lorsque cette substitution affecte le résidu 37 (variant βC) et non lorsqu'elle affecte le résidu 36 (variant βE).

étaient suivis, deux positions plus loin dans la chaîne polypeptidique, par un résidu glutamyle ou un autre résidu phosphosérile; cette observation conduisait à supposer l'existence d'un 'code de phosphorylation' selon lequel serait phosphorylé tout résidu sérile — en position n — suivi en position $n + 2$ d'un résidu glutamyle ou d'un résidu déjà phosphorylé. Nous avons, depuis, rectifié une erreur portant sur la séquence au voisinage du résidu sérile 75 de la caseine α_{s1} , qui est bien, en fait, lui aussi suivi deux positions plus loin par un résidu glutamyle [13]; il n'y a donc plus d'exception, dans les caséines α_{s1} et β à la règle proposée par Mercier et al. [1]. Dans la caséine κ , par contre, si le seul résidu phosphorylé répond bien également à cette règle, il existe par ailleurs, dans le caséino-macropéptide, un résidu sérile et 4 résidus thréonyle qui devraient être phosphorylés et qui ne le sont pas [14]. Mais il a été suggéré que la phosphorylation de ces résidus est rendue impossible par une glycosylation du caséino-macropéptide, affectant une partie au moins de ces résidus, et survenant avant la phosphorylation [14].

L'étude de deux variants électrophorétiques des caséines α_{s1} et β , $\alpha_{s1} D$ et βC , semble apporter des arguments en faveur du code proposé par Mercier et al. [1]. En effet, le variant $\alpha_{s1} D$ se caractérise par l'apparition d'un résidu phosphothréonyle en position 53 (au lieu d'un résidu alanyle); or la position 55

est occupée par un résidu glutamyle; à l'inverse, le remplacement dans le variant βC du résidu glutamyle 37 de la séquence de référence (βA^2) par un résidu lysyle s'accompagne de la déphosphorylation du résidu sérile 35 (fig. 2) [3].

L'intérêt présenté par le variant βE découle du rapprochement que l'on est amené à faire entre βE et βC . Ces deux variants diffèrent en effet tous deux de βA^2 par la même substitution Glu \rightarrow Lys: or cette substitution s'accompagne de la déphosphorylation du résidu sérile 35 lorsqu'elle affecte la position 37 (βC) mais non pas lorsqu'elle affecte la position 36 (βE) (fig. 2); on peut donc voir, dans les caractéristiques du variant βE , un nouvel élément tendant à confirmer l'existence du code de phosphorylation des caséines bovines proposé par Mercier et al. [1].

Références

- [1] Mercier, J. C., Grosclaude, F. et Ribadeau-Dumas, B. (1971) *Eur. J. Biochem.* 23, 41.
- [2] Voglino, G. F. (1972) *Anim. Blood Grps., Biochem. Genet.* 3, 61.
- [3] Grosclaude, F., Mahé, M. F., Mercier, J. C. et Ribadeau-Dumas, B. (1972) *Eur. J. Biochem.* 26, 328.
- [4] Mercier, J. C., Maubois, J. L., Poznanski, S. et Ribadeau-Dumas, B. (1968) *Bull. Soc. Chim. Biol.* 50, 521.
- [5] Grosclaude, F., Mercier, J. C. et Ribadeau-Dumas, B. (1970) *Eur. J. Biochem.* 14, 98.
- [6] Mercier, J. C., Grosclaude, F. et Ribadeau-Dumas, B. (1970) *Eur. J. Biochem.* 14, 108.
- [7] Ribadeau-Dumas, B., Brignon, G., Grosclaude, F. et Mercier, J. C. (1971) *Eur. J. Biochem.* 20, 264.
- [8] Mercier, J. C., Grosclaude, F. et Ribadeau-Dumas, B. (1970) *Eur. J. Biochem.* 16, 439.
- [9] Ribadeau-Dumas, B., Grosclaude, F. et Mercier, J. C. (1970) *Eur. J. Biochem.* 14, 451.
- [10] Ribadeau-Dumas, B., Grosclaude, F. et Mercier, J. C. (1971) *Eur. J. Biochem.* 18, 252.
- [11] Ribadeau-Dumas, B., Grosclaude, F. et Mercier, J. C. (1972) *Eur. J. Biochem.* 25, 505.
- [12] Mercier, J. C., Brignon, G. et Ribadeau-Dumas, B. (1973) *Eur. J. Biochem.* 35, 222.
- [13] Grosclaude, F., Mahé, M. F. et Ribadeau-Dumas, B. (1973) *Eur. J. Biochem.* 40, 323.
- [14] Mercier, J. C., Uro, J., Ribadeau-Dumas, B. et Grosclaude, F. (1972) *Eur. J. Biochem.* 27, 535.