

CHROM. 7111

TAMISAGE MOLÉCULAIRE SUR SEPHAROSE 6B

RELATIONS EMPIRIQUES ENTRE LE COEFFICIENT DE DISTRIBUTION ET LE RAYON DE STOKES D'UNE PART, ET LE POIDS MOLÉCULAIRE D'AUTRE PART, DE PROTÉINES DE DEGRÉS D'ASYMÉTRIE VARIÉS*

SYLVAIN DEMASSIEUX** et JEAN-PAUL LACHANCE

Département de Biochimie, Université de Montréal, Montréal (Canada)

(Reçu le 26 septembre 1973)

SUMMARY

Molecular filtration on Sepharose 6B. Empiric relationships between the distribution coefficient and the Stokes radius on the one hand and the molecular weight on the other of proteins of different degrees of asymmetry

The distribution coefficient, K_d , of macromolecular proteins as determined by Sepharose 6B filtration is a linear function of the logarithm of the Stokes radius for all values of the frictional ratio, f/f_0 . The distribution coefficient is a linear function of the logarithm of the product of the frictional ratio and the cube root of the molecular weight. The distribution coefficient is thus a linear function of the logarithm of the molecular weight for a given value of the frictional ratio. In this coordinate system, a family of parallel lines exist, each one corresponding to a unique value of the frictional ratio.

INTRODUCTION

Au cours de nos recherches¹, nous avons été amenés à déterminer le rayon de Stokes de la palmitate synthétase de foie de lapin et nous avons pour cela fait appel à la méthode chromatographique de filtration sur gel.

Se basant sur l'équation de Renkin², Ackers³ a montré que le coefficient de distribution, K_d , formulé par Gelotte⁴ est relié au rayon de Stokes d'une manière plus étroite qu'il ne l'est au poids moléculaire. L'équation d'Ackers s'écrit:

$$K_d = (V_e - V_0)/V_t = (1 - a/r)^2[1 - 2.104(a/r) + 2.09(a/r)^3 - 0.95(a/r)^5] \quad (1)$$

* Cet article constitue une partie d'une thèse présentée en vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctor en biochimie.

** Adresse actuelle: Lady Davis Institute for Medical Research, 3755 Chemin Ste Catherine, Montréal, Canada.

où V_e , V_0 et V_i sont respectivement le volume d'élution de la macromolécule, le volume mort de la colonne et le volume interne des pores du gel. Le rayon de Stokes de la molécule qui a pour coefficient de distribution K_d et le rayon "effectif" des pores du gel sont représentés par a et r .

La palmitate synthétase de foie de lapin possède un poids moléculaire élevé et un haut degré d'asymétrie¹. Nous avons utilisé une colonne de Sepharose 6B pour laquelle il a donc fallu établir la courbe d'étalonnage à l'aide de protéines de poids moléculaires et d'asymétries variés. Nous rapportons ici les résultats expérimentaux obtenus et l'énoncé des lois empiriques qui en découlent.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Produits

Le dithiothréitol (DTT) et l'albumine sérique de boeuf (BSA) proviennent de Calbiochem (Los Angeles, Calif., U.S.A.). Le chymotrypsinogène A (pancréas de boeuf), l'apoferritine (rate de cheval) et la γ -globuline (sérum humain) nous sont fournis par Schwarz/Mann (Orangeburg, N.Y., U.S.A.). La glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase et l'aldolase de muscles de lapin proviennent de Worthington (Freehold, N.J., U.S.A.). La DL-alanyl-DL-alanine provient de Mann Labs. (New York, N.Y., U.S.A.) et le Sepharose 6B de Pharmacia (Uppsala, Suède). Le cytochrome *c* (coeur de boeuf) a été préparé selon la méthode de Paul⁵ et la palmitate synthétase de foie de lapin selon celle de Demassieux et Lachance¹. Les chromatophores de *Rhodospirillum rubrum*, préparés selon la méthode de Noël *et al.*⁶, nous ont été offerts par le Dr. Gingras*. Le fibrinogène bovin (98–99% coagulable) nous a été offert par le Dr. Capet-Antonini**. Les produits d'usage courant proviennent de Fisher Scientific (Fair Lawn, N.J., U.S.A.).

Préparation de la colonne

Le Sepharose 6B est lavé plusieurs fois à l'eau désionisée et dégazée, puis équilibré à 10°C dans un tampon phosphate de potassium 0.1 *M* de pH 7.0 et contenant du DTT 1 *mM* et de l'EDTA*** 1 *mM* (tampon d'élution). Une colonne (100 × 1.5 cm) est remplie de gel qu'on laisse sédimenter par gravité pendant 12 h. La colonne est d'abord éluee de haut en bas sous une pression hydrostatique nécessaire à l'obtention d'un débit de 4 ml/h avec un volume du tampon d'élution égal à trois fois le volume de la colonne. On effectue ensuite une élution de bas en haut avec un volume de tampon égal à deux fois celui de la colonne.

Préparation des échantillons

La γ -globuline, la BSA, le chymotrypsinogène A, le cytochrome *c* et la palmitate synthétase ont été dissous dans le tampon d'élution et centrifugés à 17 000 *g* pendant 10 min pour éliminer éventuellement le matériel insoluble. La glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase, l'aldolase et le fibrinogène ont été dialysés contre

* Département de Biochimie, Faculté de Médecine, Université de Montréal, Montréal, Canada.

** Département de Pharmacodynamie Biochimique, Faculté de Pharmacie, Université de Montréal, Montréal, Canada.

*** EDTA = Acide éthylène diamine tétraacétique.

le tampon d'élution et centrifugés à 17 000 *g* pendant 10 min. Les échantillons (0.5 à 1 ml) contiennent de 5 à 10 mg de l'une des protéines mentionnées ci-dessus.

Étalonnage de la colonne

Le volume mort de la colonne a été déterminé avec des chromatophores de *Rhodospirillum rubrum* (diamètre moyen 1000 Å) et le volume interne des pores du gel avec la DL-alanyl-DL-alanine. Les échantillons sont déposés à la base de la colonne et chromatographiés à 10°C avec un débit de 3.3 ml/h. L'éluat est recueilli en fractions de vingt gouttes (0.58 ml). Le profil d'élution est suivi au spectrophotomètre Zeiss (PM Q II + M4 Q III) (Zeiss, Oberkochen, Württemberg, Allemagne) par la mesure de l'absorbance à 280 nm dans des cellules de 0.3 ml. Les protéines ont été chromatographiées séparément.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Les résultats relatifs à l'étalonnage de la colonne sont résumés dans le Tableau I. Le rayon "effectif" moyen \bar{r} des pores du gel calculé à l'aide de l'équation d'Ackers (éqn. 1) est de 390 Å avec un coefficient de variation de 4.3 %.

TABEAU I

ÉTALONNAGE DE LA COLONNE DE SEPHAROSE 6B

Le rayon de Stokes a été calculé à partir des valeurs des coefficients de diffusion à l'aide de l'équation de Stokes-Einstein, $a = kT/6\pi\eta D$. Le rapport a/r est calculé à l'aide de l'équation d'Ackers³ (éqn. 1). Le rapport f/f_0 est calculé à l'aide de l'éqn. 2. a = réf. 9; b = réf. 12; c = réf. 13; d = réf. 14; e = réf. 15; f = réf. 16; g = réf. 17; h = réf. 18; i = réf. 19.

Protéines (ou dipeptide)	K_d	a (Å)	P.M. $\times 10^{-3}$	a/r	\bar{r} (Å)	f/f_0
Chromatophores	0	1000	—	—	—	—
Fibrinogène	0.29	107 ^a	330 ^a	0.2470	433	2.34
Palmitate synthétase	0.365	81	450	0.2077	—	1.63
Apoferritine	0.462	61 ^b	480 ^c	0.1650	370	1.20
γ -Globuline	0.54	52 ^d	160 ^e	0.1348	391	1.45
Aldolase	0.58	45 ^f	149 ^f	0.1194	377	1.30
G-3-P déshydrogénase	0.607	39.2 ^f	120 ^f	0.1115	385	1.20
BSA	0.66	34.9 ^g	65 ^g	0.0944	376	1.31
Chymotrypsinogène A	0.79	23.2 ^h	25 ^h	0.0550	407	1.20
Cytochrome c	0.85	18.8 ⁱ	13.3 ⁱ	0.0393	417	1.20
DL-Alanyl-DL-alanine	1	—	0.16	—	—	—

Pour des protéines sensiblement "globulaires", il existe une relation linéaire entre le logarithme du poids moléculaire et le coefficient de distribution (Fig. 1). Cette relation n'est pas vérifiée pour des protéines non "globulaires". C'est le cas très net du fibrinogène ($f/f_0 = 2.34$), de la γ -globuline ($f/f_0 = 1.45$) et à un degré moindre de la BSA ($f/f_0 = 1.31$).

Nous avons pensé qu'il devait exister une relation entre le poids moléculaire et le coefficient de distribution quelle que soit l'asymétrie de la molécule à la condition de faire intervenir un facteur de forme. Ce facteur de forme peut être représenté par le rapport des coefficients de friction molaire f/f_0 qui est le produit de deux termes

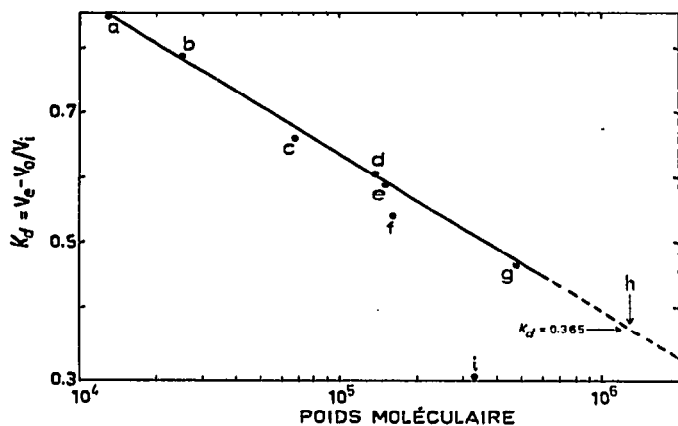


Fig. 1. Étalonnage de la colonne de Sepharose 6B; K_d en fonction du logarithme du poids moléculaire. Les abréviations sont: a = cytochrome c; b = chymotrypsinogène A; c = BSA; d = glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase; e = aldolase; f = γ -globuline; g = apoferritine; h = palmitate synthétase de foie de lapin; i = fibrinogène.

représentant l'un l'asymétrie et l'autre le degré d'hydratation de la molécule. Le rapport des coefficients de friction molaire est relié au rayon de Stokes selon l'éqn. 2:

$$a = (f/f_0) (3\bar{v}/4\pi N)^{1/3} M^{1/3} \quad (2)$$

où \bar{v} est le volume spécifique partiel.

Nous avons porté le coefficient de distribution en fonction du rayon de Stokes (Fig. 2). Les valeurs du coefficient de distribution ont été obtenues expérimentalement,

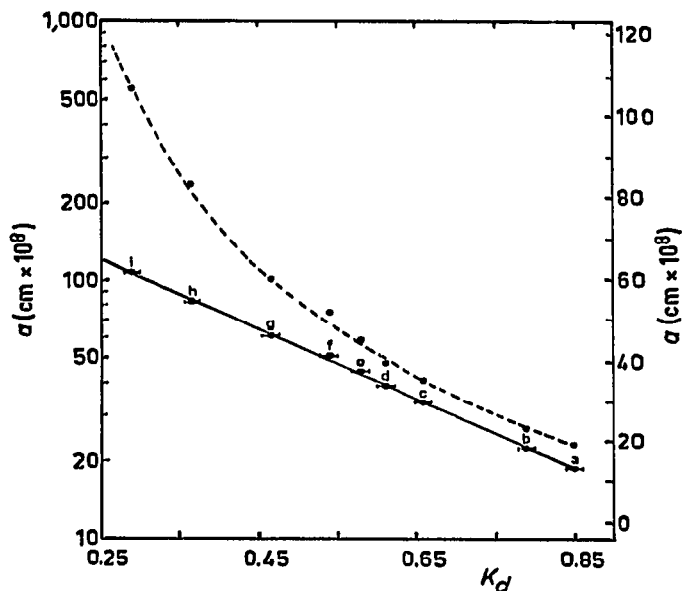


Fig. 2. Étalonnage de la colonne de Sepharose 6B; K_d en fonction du rayon de Stokes (---) ou du logarithme du rayon de Stokes (—). Les abréviations sont celles de la Fig. 1. La méthode des moindres carrés a été utilisée pour tracer la droite $K_d = f(\log a)$.

tandis que celles du rayon de Stokes sont prises dans la littérature ou bien calculées à l'aide de l'équation de Stokes-Einstein:

$$a = kT/6\pi\eta_{20,w}D_{20,w}$$

où k est la constante de Boltzmann, T la température 293.2°K, et où $D_{20,w}$ et $\eta_{20,w}$ sont respectivement la constante de diffusion de la protéine dans l'eau à 20°C et la viscosité de l'eau à 20°C.

Les résultats de la Fig. 2 indiquent clairement que le coefficient de distribution est une fonction linéaire du logarithme du rayon de Stokes. Nous avons donc au départ une relation empirique précise quelle que soit le degré d'asymétrie de la molécule. Cette relation peut s'écrire:

$$\log a = -AK_d + B^* \quad (3)$$

A et B sont des constantes qui dépendent essentiellement de la nature du gel employé.

Puisque la relation 3 est valable quelle que soit la valeur de f/f_0 , nous pouvons remplacer, dans cette relation, a par sa valeur tirée de l'éqn. 2.

$$\log [(f/f_0) M^{\frac{1}{3}}] = -AK_d + B - \frac{1}{3} \log (3\bar{v}/4\pi N) \quad (4)$$

En admettant que \bar{v} soit constant pour toutes les protéines, ce qui est vrai en première approximation, l'éqn. 4 s'écrit:

$$\log [(f/f_0) M^{\frac{1}{3}}] = -AK_d + C \quad (5)$$

Le logarithme du produit de f/f_0 par la racine cubique du poids moléculaire est une fonction linéaire du coefficient de distribution. La Fig. 3 rend compte des résultats

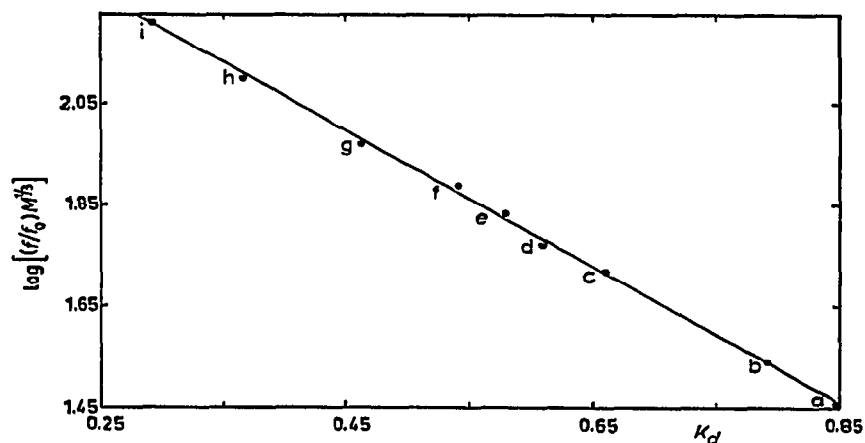


Fig. 3. Étalonnage de la colonne de Sepharose 6B; K_d en fonction du logarithme du produit $(f/f_0)M^{\frac{1}{3}}$. Les abréviations sont celles de la Fig. 1.

* Les valeurs expérimentales de A et B sont respectivement de 1.30 et de 2.395 à la condition d'exprimer le rayon de Stokes en Å.

obtenus où en ordonnée sont rapportées les valeurs données dans la littérature du produit $(f/f_0)M^{\frac{1}{2}}$ sous sa forme logarithmique.

L'éqn. 4 peut se mettre sous la forme suivante:

$$\log M = -3AK_d + 3B - \log(3\bar{v}/4\pi N) - 3 \log(f/f_0)$$

soit encore

$$\log M = -3AK_d + C' - 3 \log(f/f_0) \quad (6)$$

Cette équation montre, qu'en toute rigueur, le logarithme du poids moléculaire n'est une fonction linéaire du coefficient de distribution que pour des protéines de même rapport f/f_0 . Cette relation est celle que nous cherchions.

Nous voyons à l'examen de l'éqn. 6 qu'il existe une famille de droites parallèles. À chacune de ces droites il correspond une seule valeur de f/f_0 . La Fig. 4 traduit les résultats expérimentaux obtenus. Le coefficient de distribution K_d est mesuré, les valeurs du poids moléculaire et du rapport des coefficients de friction molaire sont issues de la littérature. Pour obtenir le tracé de ces droites il suffit de connaître les constantes A et C' et pour cela un étalonnage à l'aide de deux protéines de poids molé-

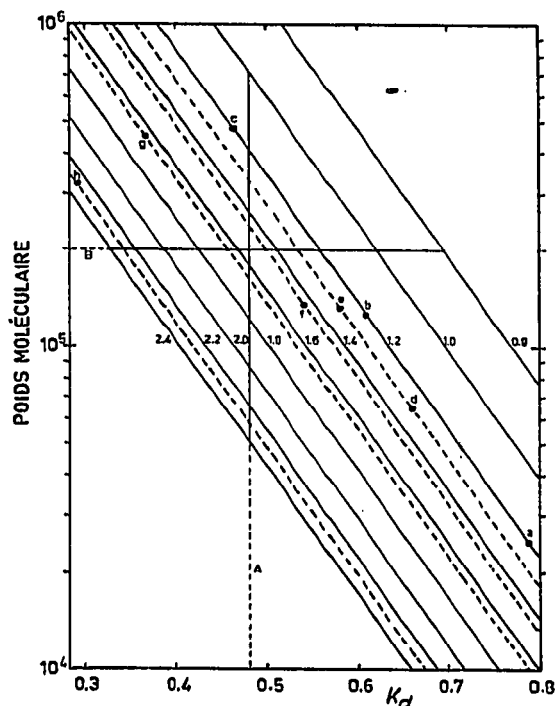


Fig. 4. Étalonage de la colonne de Sepharose 6B; K_d en fonction du logarithme du poids moléculaire pour différentes valeurs de f/f_0 . Les abréviations sont: a = chymotrypsinogène A; b = glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase; c = apoferritine; d = BSA; e = aldolase; f = γ -globuline; g = palmitate synthétase de foie de lapin; h = fibrinogène. Les valeurs du rapport f/f_0 attribuées aux droites parallèles en pointillé sont respectivement de droite à gauche 1.30, 1.45, 1.63 et 2.34.

culaire connu et de même rapport f/f_0 est nécessaire. Sur la Fig. 4 ces droites ont été représentées pour des valeurs théoriques de f/f_0 de 0.8 à 2.4 (traits pleins).

Nous avons appliqué ces résultats à l'étude de la palmitate synthétase de foie de lapin. Le coefficient de distribution de l'enzyme est de 0.365 auquel correspond un rayon de Stokes de $81 \cdot 10^{-8}$ cm calculé à l'aide de l'équation d'Ackers (éqn. 1). Nous trouvons une valeur de $83 \cdot 10^{-8}$ cm à partir de notre équation (éqn. 3). Le poids moléculaire de la palmitate synthétase de foie de lapin déterminé par sédimentation à l'équilibre est de 450 000 daltons¹. Avec ces valeurs du poids moléculaire et du rayon de Stokes déterminées de manière indépendante on peut trouver à l'aide de la Fig. 4 ou de l'éqn. 6 une valeur de 1.63 pour f/f_0^* . Les valeurs rapportées par Smith et Abraham⁷ à partir des données de Yang *et al.*⁸ sont respectivement de $82.6 \cdot 10^{-8}$ cm et 1.62 pour le rayon de Stokes et le rapport des coefficients de friction f/f_0 de la palmitate synthétase de foie de pigeon.

Le coefficient de distribution du fibrinogène, protéine très asymétrique, est de 0.29. A cette valeur du K_d il correspond un poids moléculaire de 2 600 000 daltons si l'on ne tient pas compte de l'asymétrie (Fig. 1). Si l'on admet une valeur de 2.34 pour le rapport f/f_0 du fibrinogène, on trouve un poids moléculaire de 320 000 daltons (Fig. 4). Cette valeur représente à 3 % près celle obtenue par Scheraga et Laskowski⁹ pour le fibrinogène bovin. Si l'on admet avec Capet-Antonini et Guinand¹⁰ un poids moléculaire de 340 000 daltons, le rapport f/f_0 est de 2.25 (Fig. 4 ou éqn. 6).

En conclusion, nous avons mis en évidence par filtration sur gel, le Sepharose 6B en l'occurrence, une relation empirique entre le rayon de Stokes et le coefficient de distribution, relation représentée par l'éqn. 3. Cette équation nous permet ensuite de relier le poids moléculaire au coefficient de distribution sous la forme de l'éqn. 6. Anderson et Stoddart¹¹ ont mis en évidence une relation linéaire entre le poids moléculaire et le coefficient de distribution sous la forme de l'équation suivante:

$$K_d = -b \log M + c.$$

Cette relation, qui ne tient pas compte de l'asymétrie de la molécule, ne s'applique qu'à des molécules de même f/f_0 , et n'a pas, par conséquent, le caractère de généralité que possède notre équation (éqn. 6). En toute rigueur, c est une fonction de f/f_0 .

REMERCIEMENTS

Ce travail a été rendu possible grâce à une subvention du Conseil des Recherches Médicales du Canada, ainsi qu'à l'octroi d'une bourse France-Quebec.

RÉSUMÉ

Le coefficient de distribution, K_d , de macromolécules protéiques déterminé par filtration sur Sepharose 6B est une fonction linéaire du logarithme du rayon de Stokes indépendamment de la valeur du rapport des coefficients de friction molaire, f/f_0 . Le

* Les valeurs expérimentales de A et C' sont respectivement de 1.30 et 7.721 à la condition d'exprimer le rayon de Stokes en Å et de prendre pour \bar{v} la valeur 0.734 ml/g.

coefficient de distribution est une fonction linéaire du logarithme du produit de f/f_0 par la racine cubique du poids moléculaire. Le coefficient de distribution est par conséquent une fonction linéaire du logarithme du poids moléculaire pour une même valeur de f/f_0 . Il existe une famille de droites parallèles dans ce dernier système de coordonnées. À chacune de ces droites il correspond d'une manière bi-univoque une seule valeur du rapport f/f_0 .

RÉFÉRENCES

- 1 S. Demassieux et J.-P. Lachance, *Biochim. Biophys. Acta*, sous presse.
- 2 E. M. Renkin, *J. Gen. Physiol.*, 38 (1955) 225.
- 3 G. K. Ackers, *Biochemistry*, 3 (1964) 723.
- 4 B. Gelotte, *J. Chromatogr.*, 3 (1960) 330.
- 5 K. G. Paul, *Methods Enzymol.*, 2 (1955) 749.
- 6 H. Noël, M. van der Rest et G. Gingras, *Biochim. Biophys. Acta*, 275 (1972) 219.
- 7 S. Smith et S. Abraham, *J. Biol. Chem.*, 245 (1970) 3209.
- 8 P. C. Yang, R. M. Bock, R. Y. Hsu et J. W. Porter, *Biochim. Biophys. Acta*, 110 (1965) 608.
- 9 H. A. Scheraga et M. Laskowski, *Adv. Protein Chem.*, 12 (1957) 1.
- 10 F. C. Capet-Antonini et S. Guinand, *Biochim. Biophys. Acta*, 200 (1969) 486.
- 11 D. M. W. Anderson et J. F. Stoddart, *Anal. Chim. Acta*, 34 (1966) 401.
- 12 A. Rothen, *J. Biol. Chem.*, 152 (1944) 679.
- 13 P. M. Harrison, *J. Mol. Biol.*, 6 (1963) 404.
- 14 J. C. Nichol et H. F. Deutsch, *J. Amer. Chem. Soc.*, 70 (1948) 80.
- 15 H. E. Schultze, R. Schmidtberger et H. Haupt, *Biochem. Z.*, 329 (1958) 490.
- 16 J. F. Taylor et C. Lowry, *Biochim. Biophys. Acta*, 20 (1956) 109.
- 17 J. M. Creeth, *Biochem. J.*, 51 (1952) 10.
- 18 P. E. Wilcox, J. Kraut, R. D. Wade et H. Neurath, *Biochim. Biophys. Acta*, 24 (1957) 72.
- 19 A. Ehrenberg, *Acta Chem. Scand.*, 11 (1957) 1257.