

ISOLEMENT ET PROPRIETES DE LA CREATINE-KINASE DE MUSCLE LISSE DE BOEUF

Bruno FOCANT *

*Laboratoire de Biologie générale, Institut Van Beneden,
Université de Liège, B-4000 Liège, Belgique*

Reçu le 17e juillet 1970

A method of isolation of the isoenzyme BB of creatine kinase from ox stomach is described taking into account its high instability and the presence of notable amounts of tropomyosin in vertebrate smooth muscle extracts of low ionic strength. The molecular parameters of the enzyme isolated from ox stomach do not differ from those of the creatine kinases MM and BB of vertebrates. The amino acid composition and the peptide maps reveals significant differences from that of the ox brain isoenzyme BB.

1. Introduction

Eppenberger et al. [1] ont montré qu'il existe trois types d'isoenzymes de la créatine-kinase (ATP créatine phosphotransférase, EC 2.7.3.2): le type BB du cerveau, le plus chargé négativement à pH neutre, le type MM propre au muscle strié et le type hybride MB présent principalement dans le muscle cardiaque. Ces isoenzymes ont fait l'objet de nombreuses recherches [2]. Dans le cas du muscle lisse, la créatine-kinase représente une fraction importante du myogène et n'a été étudiée que par des mesures d'activité sur des extraits totaux de tunique musculaire de vaisseaux [3] et d'utérus [4]. Nous avons établi précédemment que l'enzyme présent dans les carotides de boeuf est exclusivement du type BB [5].

L'étude comparative des créatine-kinases de différents muscles lisses à innervation individuelle ou pluricellulaire du boeuf, du cobaye et de la poule a établi le caractère général de cette observation (fig. 1). Chez la poule nous trouvons une bande supplémentaire BB mais celle-ci est propre aux oiseaux comme l'ont récemment montré Scholl et Eppenberger [6] dans le cas du muscle cardiaque et du cerveau. La cellule musculaire lisse possédant uniquement le type BB se serait arrêtée dans son développe-

ment à un stade morphologique peu spécialisé contrairement aux muscles squelettique et cardiaque qui évoluent du type BB au type MB et MM. Cette particularité du muscle lisse nous a incité à isoler l'isoenzyme BB de ce tissu.

Nous avons mis au point un mode opératoire applicable aux muscles lisses de vertébrés et comparé les principales caractéristiques physico-chimiques et chimiques de cet isoenzyme à celles des isoenzymes MM du muscle strié et BB de cerveau de même origine.

2. Matériel et méthodes

La tunique musculaire de la carotide de boeuf (*Bos taurus*) est débarrassée de l'adventice selon la technique décrite par Laszt et Hamoir [7]. La couche musculaire du bonnet de l'estomac de boeuf est aisément séparée de la muqueuse interne et de la lame conjonctive externe dans un délai de 1 à 2 h après l'abattage. L'activité enzymatique est mesurée selon la méthode de Tanzer et Gilvarg [8] basée sur la variation d'absorption à 340 nm du milieu tam-

* Aspirant du Fonds National de la Recherche Scientifique.

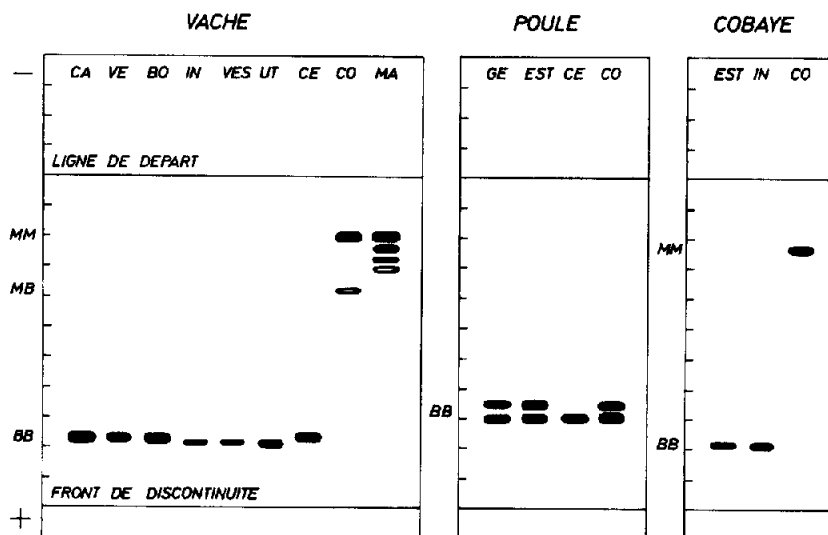


Fig. 1. Comparaison des mobilités électrophorétiques en gel d'amidon à pH 8,6 des créatine-kinases de muscles lisses, de cerveau, de coeur et de muscle squelettique (mâchoire) dans le cas des divers vertébrés. L'échelle située sur la gauche de chaque rectangle représente la migration en cm. Nous avons eu recours aux abréviations suivantes: carotides: CA; veine cave inférieure: VE; bonnet: BO; intestin: IN; vessie: VES; utérus gravide: UT; cerveau: CE; coeur: CO; mâchoire: MA; gésier: GE et estomac: EST.

ponné de pH 8,5 contenant de la LDH, de la PK, du NADH (H^+), de l'ATP et de la créatine. Elle est exprimée en μM de créatine phosphorylée par minute et par mg de protéine à 20° .

La concentration en protéines est déterminée par la méthode du biuret [9].

La purification de l'enzyme est suivie par électrophorèse en gel d'amidon vertical à pH 8,6 au moyen de l'appareil décrit par Scopes [10] et par ultracentrifugation dans une ultracentrifugeuse Spinco modèle E. La diffusion et le poids moléculaire sont déterminés grâce au même appareil à faible vitesse et à 5° dans un tampon phosphatique de force ionique totale de 0,2 et de pH 7,3, 0,15 M en NaCl. La sédimentation d'équilibre a été réalisée dans une cellule à double secteur aux concentrations de 0,25 et 0,35% et à la vitesse de 7.928 tours par min. Le calcul du poids moléculaire a été effectué selon O'Donnell et Woods [11]. Nous avons déterminé la composition en acides aminés de cette créatine-kinase par la technique de Spackman et al. [12] au moyen de l'analyseur Spinco modèle 120 B. L'analyse a porté sur des préparations natives, carboxyméthylées ou oxydées par l'acide performique, hydrolysées en tubes scellés pendant 24, 48 et 87 h à $107 \pm 1^\circ$.

Pour l'obtention des cartes peptidiques l'enzyme est d'abord réduit par le 2-mercaptoéthanol en présence d'urée selon Anfinsen et Haber [13] et alkylé par l'iodoacétate selon Crestfield et al. [14]. La préparation est ensuite digérée par la trypsine pendant 7 h dans le tampon $(NH_4)_2CO_3$ 0,2 M de pH 8,6; les peptides sont séparés par chromatographie et électrophorèse sur couche mince de cellulose NM 300 de Macherey-Nagel suivant une technique dérivée de celle décrite par Burns et Turner [15].

Les groupements SH libres et totaux sont dosés selon Ellman [16] par réaction avec le bis-*p*-nitro-phényl et l'azote amidé par la méthode de micro-diffusion de Stegemann [17].

3. Résultats et discussion

3.1. Isolement

L'enzyme a été mis en solution par homogénéisation de 100 g de tissu au mortier avec un volume d'une solution KCl 0,01 M, EDTA 0,001 M et 2-mercaptoéthanol 0,001 M de pH neutre pendant 10 min à 4° . Les extraits ont été effectués initialement à partir de carotides et fractionnés suivant diverses

méthodes élaborées en vue de l'isolement de la créatine-kinase MM ou BB [2, 18, 19]. Aucun de ces modes opératoires ne nous a toutefois permis d'obtenir une purification satisfaisante par suite de la très faible stabilité de l'isoenzyme. Il s'est avéré nécessaire de disposer d'une source de matériel plus abondante telle que le bonnet de l'estomac de boeuf et d'élaborer une méthode de purification propre au muscle lisse. La fraction de l'extrait de bonnet isolée en chambre froide entre 45 et 60% de saturation en sulfate ammonique neutre a été chromatographiée sur une colonne de DEAE-cellulose Serva 0,64 (longueur: 45 cm, diamètre: 2 cm) dans le tampon tris-Cl, 0,05 M, 2-mercaptoéthanol 0,001 M de pH 8,0. L'élution par un gradient de concentration en NaCl dans le même tampon permet d'isoler l'enzyme entre 0,3 et 0,4 M en NaCl en même temps qu'une quantité notable de tropomyosine, celle-ci s'extrayant déjà fortement à faible force ionique dans le cas du muscle lisse contrairement à celui du muscle strié [20]. La filtration sur Séphadex G-200 ne permet pas de l'éliminer. Toutefois, grâce au remplacement de la préparation de DEAE-cellulose Serva 0,64 par une préparation de DEAE-cellulose Serva SS-0,72 ce composant est légèrement retardé et peut être séparé de la créatine-kinase. La première fraction obtenue migre sous forme d'un seul gradient à l'électrophorèse en gel d'amidon à pH 8,6 et à l'ultracentrifugation analytique. Les préparations se sont révélées également homogènes par sédimentation d'équilibre pour autant que l'expérience soit réalisée à 5° afin d'éviter une dénaturation en cours d'expérience. L'activité spécifique de l'enzyme purifié varie entre 20 et 40 μ M par minute et par mg de protéine, suivant la durée de la purification.

3.2. Caractéristiques physico-chimiques et chimiques

Le poids moléculaire déterminé par extrapolation à partir de diagrammes de $1/M_{app}$ en fonction de la concentration ainsi que d'autres caractéristiques de l'enzyme sont comparées à celles de la littérature dans le tableau 1. Les propriétés macromoléculaires ne diffèrent pas, de même que le nombre et la distribution des groupes SH. L'analyse de la composition en acides aminés révèle par contre des divergences notables (tableau 2). Notre préparation a comme les autres isoenzymes BB une teneur en lysine beaucoup plus faible que celle des créatine-kinases MM. Sa teneur en azote amidé assez proche de celle de la créatine-

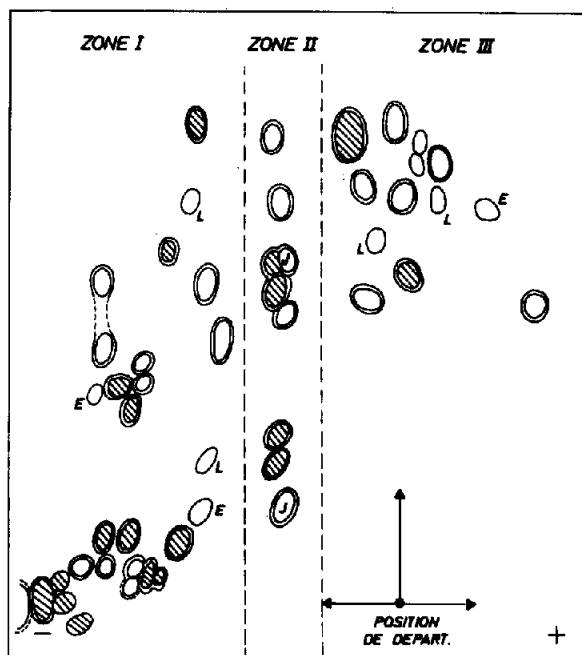


Fig. 2. Carte peptidique d'un mélange en quantités égales, de créatine-kinase d'estomac de boeuf et de muscle squelettique de lapin. Les peptides communs aux deux enzymes sont entourés d'un contour double continu; ceux propres à la créatine-kinase de lapin sont identifiés par la lettre L et ceux propres à la créatine-kinase d'estomac par la lettre E. Les taches dont la coloration est plus intense sont hachurées.

kinase MM de lapin suggère d'autre part que le nombre de groupements amides ne diffère pas fortement d'une créatine-kinase à l'autre. La mobilité électrophorétique caractéristique des isoenzymes BB à pH 8,6 est en accord avec la différence des charges négatives et positives déterminées par l'analyse (tableau 2). La composition de notre préparation est très proche de celle des créatine-kinases BB de cerveau de la poule et du lapin.

La composition de celle de cerveau de boeuf a été réexaminée par Thomson [25] à la lumière des discordances que nous avons observées avec ses résultats [21]. Les valeurs légèrement modifiées du tableau 2 diffèrent encore de nos déterminations en ce qui concerne la proline, la glycine, l'alanine et la valine.

Une étude comparée des créatine-kinases BB d'estomac et de cerveau du même animal dans les mêmes conditions expérimentales s'impose en vue d'élucider l'origine de ces divergences. D'autre part, la carte

Tableau 1
Comparaison des isoenzymes MM de muscle squelettique, BB de cerveau et BB d'estomac de boeuf.

	Isoenzyme BB d'estomac	Isoenzyme BB de cerveau	Isoenzyme MM de muscle squelettique
Coefficient de sédimentation corrigé pour l'eau et 20° (en unités Svedberg)	5,33 ($c = 0$)	4,66 [22] ($c = 0.05\%$)	4,9 ** [23] ($c = 0,8\%$)
Coefficient de diffusion corrigé pour l'eau et 20°	5,7 (valeur moyenne obtenue à $c = 0,25\%$, $c = 0,35\%$)	—	5,78 ** [23] ($c = 0,98\%$)
Poids moléculaire	83.500	80.000	84.500 [2]
Nombre de groupes SH par mole de protéine * (libres/totaux)	2/7	2/7	2/7 [21]

* On admet que toutes les créatine-kinases ont le même poids moléculaire de 81.000.

** Valeur relative au lapin, celle de boeuf n'existant pas dans la littérature.

Tableau 2

Nombre de résidus d'AA/mole de CK *	Créatine-kinase de boeuf			Créatine-kinase de poule [2]		Créatine-kinase de lapin [2]	
	BB est.	BB cerv. [25]	MM M. str. [21]	BB cerv.	MM M.str.	BB cerv.	MM M. str.
Lysine	46	44	65	49	65	52	61
Histidine	26	23	29	21	34	30	32
Arginine	44	40	34	40	40	22	33
Acide aspartique	89	83	81	87	73	82	83
Thréonine	34	34	30	35	29	34	34
Sérine	39	38	35	35	32	32	44
Acide glutamique	81	85	79	75	83	74	78
Proline	39	48	39	31	41	40	35
Glycine	59	66	65	68	60	65	64
Alanine	39	52	38	36	33	35	26
½ Cystine	10	10					
Valine	41	48	54	48	49	47	49
Methionine	17	18	18	19	20	20	17
Isoleucine	28	30	30	28	24	30	22
Leucine	76	73	68	82	71	81	72
Tyrosine	17	19	16	21	16	21	20
Phénylalanine	30	29	32	30	33	41	31
Résidus GLU + ASP (a)	170	168	160	162	156	156	161
Résidus ARG + LYS (b)	90	84	99	89	105	74	94
(a)-(b)	80	84	61	73	51	82	67
Nombre de groupes amidés	61						55 [24]

* On admet que toutes les créatine-kinases ont le même poids moléculaire de 81.000.

peptidique d'un mélange en quantités égales de créatine-kinase MM de lapin et BB d'estomac de boeuf, comparée aux cartes de ces créatines-kinases (fig. 2) indique une grande similitude des peptides neutres au niveau desquels se trouve le site actif (zone II). Les divergences de composition des créatine-kinases portent principalement sur les peptides acides et basiques.

Remerciements

Nous remercions vivement Monsieur le professeur G.Hamoir de ses conseils au cours de cette étude ainsi que Monsieur Ch.Gerday, premier assistant, qui a déterminé la composition en acides aminés de notre enzyme.

Références

- [1] H.M.Eppenberger, M.E.Eppenberger, R.Richterich et H. Aebi, *Developmental Biol.* 10 (1964) 1.
- [2] H.M.Eppenberger, D.M.Dawson et N.O.Kaplan, *J. Biol. Chem.* 242 (1967) 204.
- [3] J.E.Kirk, *J. Gerontol.* 17 (1962) 369.
- [4] A.Lanza, *Experientia* 24 (1968) 337.
- [5] B.Focant, *Arch. Intern. Physiol. Biochim.* 76 (1968) 373.
- [6] A.Scholl et H.M.Eppenberger, *Experientia* 25 (1969) 794.
- [7] L.Lasz et G.Hamoir, *Biochim. Biophys. Acta* 50 (1961) 430.
- [8] M.L.Tanzer et C.Gilvarg, *J. Biol. Chem.* 234 (1959) 3201.
- [9] A.G.Gornall, C.J.Bardawill et M.M.David, *J. Biol. Chem.* 177 (1949) 751.
- [10] R.K.Scopes, *Biochem. J.* 107 (1968) 139.
- [11] J.O'Donnell et E.F.Woods, in: *Modern Methods of Plant Analysis*, Vol. 5, eds. K.Paech et M.V.Tracey (Springer, Berlin, 1962) pp. 250-335.
- [12] D.H.Spackman, W.H.Stein et S.Moore, *Anal. Chem.* 30 (1958) 1190.
- [13] C.B.Anfinsen et E.Haber, *J. Biol. Chem.* 236 (1961) 1361.
- [14] A.M.Crestfield, S.Moore et W.H.Stein, *J. Biol. Chem.* 238 (1963) 622.
- [15] D.J.W.Burns et N.A.Turner, *J. Chromatogr.* 30 (1967) 469.
- [16] G.Ellman, *Arch. Biochem. Biophys.* 82 (1959) 70.
- [17] H.Stegemann, *Z. Physiol. Chem.* 312 (1958) 255.
- [18] S.A.Kuby, L.Noda et H.A.Lardy, *J. Biol. Chem.* 209 (1954) 191.
- [19] B.T.Hooton et D.C.Watts, *Biochem. J.* 100 (1966) 637.
- [20] G.Hamoir et L.Lasz, *Biochim. Biophys. Acta* 59 (1962) 365.
- [21] A.R.Thomson, J.W.Eveleigh, J.F.Laws et B.J.Miles, in: *Biochemical evolution and homologous enzymes*, eds. N.V.Thoi et J.Roche (Gordon and Breach, New York, 1968) p. 255.
- [22] T.Wood, *Biochem. J.* 87 (1963) 453.
- [23] L.Noda, S.A.Kuby et H.A.Lardy, *J. Biol. Chem.* 209 (1954) 203.
- [24] T.A.Mahowald, E.A.Noltmann et S.A.Kuby, *J. Biol. Chem.* 237 (1962) 1535.
- [25] A.R.Thomson, communication personnelle.