

## LOCALISATION, DANS LA PARTIE NH<sub>2</sub>-TERMINALE DE LA CASÉINE $\alpha_{s1}$ BOVINE, D'UNE DÉLÉTION DE 13 ACIDES AMINÉS DIFFÉRENCIANT LE VARIANT A DES VARIANTS B ET C

François GROSCLAUDE, Marie-Françoise MAHÉ, Jean-Claude MERCIER et Bruno RIBADEAU-DUMAS  
*Laboratoire de Génétique biochimique et Laboratoire de recherches sur les protéines, I.N.R.A. Jouy-en-Josas, France*

Received 24 September 1970

The A variant of bovine  $\alpha_{s1}$  casein is devoid of the segment of 13 amino acid residues which occupies the 14th to 26th position from the NH<sub>2</sub>-terminal in the polypeptide chain (198 residues) of the B and C variants.

### 1. Introduction

La caséine  $\alpha_{s1}$  bovine, dont nous achevons d'établir la structure primaire (198 résidus d'acides aminés, [1–5]), existe sous plusieurs formes génétiquement déterminées, ou variants. On a décrit jusqu'à présent les quatre variants A, B, C [6] et D [7].  $\alpha_{s1}$ C et  $\alpha_{s1}$ D diffèrent chacun d' $\alpha_{s1}$ B par la substitution d'un seul acide aminé [8, 9]. Les résultats de Kalan et al. [10] et Thompson et al. [11] indiquent par contre qu' $\alpha_{s1}$ A diffère des autres variants par une altération importante de la chaîne polypeptidique, dont la nature n'a toutefois pas été précisée; Thompson et al. suggèrent qu'à la substitution d'un acide aminé (Lys/Asn) s'ajoute la délétion d'un segment de 8 autres résidus (Ala, Val, Leu<sub>3</sub>, Phe<sub>2</sub>, Arg); les fingerprints chymotrypsiques des variants B et C diffèrent en plusieurs points de celui du variant A: un peptide de séquence Arg–Phe–Phe, en particulier, ne se retrouve pas dans le fingerprint du variant A [11].

En nous référant à la séquence partielle de la caséine  $\alpha_{s1}$ B établie par notre équipe [5], nous avons recherché dans quelle partie de la chaîne polypeptidique pouvait se situer la délétion d'un segment ayant la composition proposée par Thompson et al. [11], et conclu que cette délétion ne pouvait se placer que dans la partie NH<sub>2</sub>-terminale, dans la région comprenant le résidu arginyle 22.

Nous montrons dans le présent travail que la partie NH<sub>2</sub>-terminale de la chaîne polypeptidique du variant  $\alpha_{s1}$ A diffère de celle des variants  $\alpha_{s1}$ B et  $\alpha_{s1}$ C par la

délétion d'un segment de 13 acides aminés, allant des positions 14 à 26 incluses dans la séquence du variant de référence  $\alpha_{s1}$ B.

### 2. Méthodes et résultats

A défaut d'un lait de vache homozygote pour l'allèle  $\alpha_{s1}$ -Cn<sup>A</sup>, nous disposons de celui d'une vache de race Holstein-Friesian canadienne, de génotype hétérozygote  $\alpha_{s1}$ -Cn<sup>A</sup>/ $\alpha_{s1}$ -Cn<sup>B</sup>. La caséine  $\alpha_{s1}$ A/B a été préparée à partir de ce lait, suivant la technique de Thompson et Kiddy [12].

Nous avons décrit précédemment [3, fig. 1] le fractionnement, sur colonne de Dowex 50, des 6 peptides résultant de l'hydrolyse de la caséine  $\alpha_{s1}$ B par CNBr: le peptide NH<sub>2</sub>-terminal, CN6, comportant 54 résidus d'acides aminés est élué en dernier.

L'application des mêmes techniques à la caséine  $\alpha_{s1}$ A/B donne le même diagramme d'élution. Mais ici, la fraction correspondant au dernier pic rechromatographiée sur colonne de Sephadex G-25 and acide acétique 30% (v/v), se subdivise en deux fractions (fractions I et II dans l'ordre d'élution) contenant chacune un peptide.

La fraction I fournit le peptide CN6; elle correspond donc à la partie NH<sub>2</sub>-terminale de la caséine  $\alpha_{s1}$ B présente dans le mélange  $\alpha_{s1}$ A/B de départ. Rappelons ici que l'enchaînement des 8 peptides tryptiques de CN6 est le suivant [4]:

Tableau 1  
Composition en acides aminés des peptides CN6, CN6<sub>A</sub> et CN6<sub>AT</sub>1.

	CN6 [3]	CN6 <sub>A</sub>	Délétion = CN6–CN6 <sub>A</sub>	CN6 <sub>AT</sub> 1
	(moles d'acide aminé/mole de peptide)			
Acide aspartique	5	3,05 (3)	2	–
Thréonine	1	0,91 (1)	–	–
Sérine	3	2,62 (3)	–	–
Acide glutamique	10	8,00 (8)	2	3,19 (3)
Proline	5	4,75 (5)	–	2,96 (3)
Glycine	3	2,92 (3)	–	1,90 (2)
Alanine	2	0,90 (1)	1	–
Valine	4	1,95 (2)	2	1,00 (1)
Méthionine*	1	0,75 (1)	–	–
Isoleucine	2	2,02 (2)	–	–
Leucine	5	2,02 (2)	3	1,05 (1)
Tyrosine	–	–	–	–
Phénylalanine	4	1,91 (2)	2	1,90 (2)
Tryptophane	–	–	–	–
Lysine	5	4,92 (5)	–	0,90 (1)
Histidine	2	2,08 (2)	–	0,79 (1)
Arginine	2	1,01 (1)	1	–
Nombre de résidus	54	41	13	14

\* Sous la forme homosérine–homosérine lactone.

Tm7T3–Tm7T2–Tm7T1–Tm1T8–Tm1T6  
(= Tm1T5–Tm1T7)–CN6Tm1T1

La composition en acides aminés du peptide constituant la fraction II, CN6<sub>A</sub>, est donnée dans le tableau 1. L'hydrolyse trypsique de ce peptide fournit 7 peptides purifiés par chromatographie sur colonne de Sephadex G-15, en acide acétique 30% (v/v) et par chromatographie ou électrophorèse préparatives sur papier (mêmes méthodes que dans [1]). Six de ces peptides sont identiques aux peptides tryptiques de CN6 suivants: Tm7T3, Tm7T2, Tm1T5, Tm1T6, Tm1T7 et CN6Tm1T1 (voir l'enchaînement ci-dessus). La composition du septième peptide, CN6<sub>A</sub>T1, élué le premier sur Sephadex G-15, ne correspond à celle d'aucun des peptides tryptiques de la caséine  $\alpha_{s1}$ B, mais équivaut à la somme des compositions de Tm7T1 et Tm1T8, moins les 13 résidus suivants: Asx<sub>2</sub>, Glx<sub>2</sub>, Ala, Val<sub>2</sub>, Leu<sub>3</sub>, Phe<sub>2</sub>, Arg (tableau 1). Ces résultats suggèrent que CN6<sub>A</sub> est la partie NH<sub>2</sub>-terminale de la caséine  $\alpha_{s1}$ A présente dans le mélange  $\alpha_{s1}$ A/B de départ, et qu'une délétion de 13 acides aminés affecte, chez le variant A, la région qui, chez les variants B et C, correspond aux peptides Tm7T1 et Tm1T8.

Cette hypothèse est confirmée par l'examen de la séquence des acides aminés du peptide CN6<sub>A</sub>T1 (fig. 1). A l'exception de l'élément Pro–Phe–Pro, cette séquence a été établie à l'aide de techniques déjà

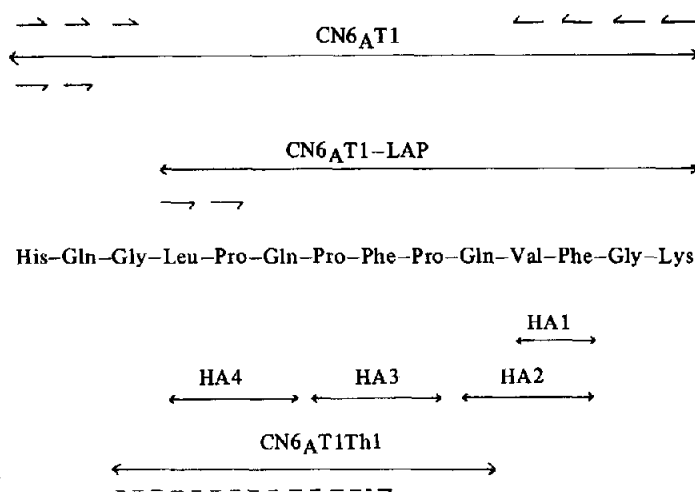


Fig. 1. Séquence des acides aminés du peptide CN6<sub>A</sub>T1: →, acide aminé libéré par la leucine aminopeptidase; ←, acide aminé libéré par les carboxypeptidases B et A; →, acide aminé identifié par la méthode soustractive d'Edman; →, séquence établie par spectrométrie de masse.

décrites hydrolyse par la leucine aminopeptidase et les carboxypeptidases A et B [2], dégradation soustractive d'Edman [2] et hydrolyse acide ménagée [5]. Le peptide CN6<sub>A</sub>T1-LAP a été préparé comme Tm7T1-LAP [4] après hydrolyse par la leucine aminopeptidase; CN6<sub>A</sub>T1Th1 a été obtenu par hydrolyse de CN6<sub>A</sub>T1 par la thermolysine (EC 3.4.4; tampon tris 0,05 M—CaCl<sub>2</sub> 0,001 M; pH 8; 8 h; 38°; rapport molaire enzyme/substrat = 1/300) et chromatographie sur colonne de Sephadex G-15 en acide acétique 30% (v/v); en ce qui concerne les peptides obtenus par hydrolyse acide ménagée, et purifiés par électrophorèse et chromatographie préparatives sur papier [1], nous ne mentionnons que ceux qui ont apporté des éléments utiles (HA1 à HA4). La mobilité électrophorétique de CN6<sub>A</sub>T1Th1 à pH 6,5 est celle d'un peptide neutre, ce qui prouve que les deux résidus Glx de ce peptide sont des glutaminyles. Enfin, la spectrométrie de masse, appliquée à CN6<sub>A</sub>T1Th1, après *N*-acétylation et perméthylation [13, 14], a permis de déterminer la séquence des 6 premiers résidus de ce peptide, donc d'élucider complètement celle de CN6<sub>A</sub>T1.

### 3. Discussion

Les résultats précédents s'interprètent (fig. 2) en admettant que le peptide CN6<sub>A</sub> représente la partie NH<sub>2</sub>-terminale de la chaîne polypeptidique du variant A et que cette dernière diffère de celle des variants B et C par la délétion du segment de 13 résidus d'acides aminés allant des positions 14 à 26 incluses dans la séquence du variant de référence  $\alpha_{s1}$ B (identique dans cette partie NH<sub>2</sub>-terminale à celle du variant  $\alpha_{s1}$ C [8]). Au niveau chromosomique on peut considérer que la délétion du segment d'ADN correspondant s'est faite, de part et d'autre, entre deux triplets de codage d'acides aminés.

Nous nous proposons de rechercher si d'autres altérations caractérisent le variant  $\alpha_{s1}$ A ailleurs que dans la partie NH<sub>2</sub>-terminale, ce qui, comptetenu de résultats préliminaires, nous semble peu vraisemblable. Dans l'hypothèse où la différence entre les variants A et B se limite à la délétion mise en évidence dans ce travail, le variant A possède à pH 8,5, une charge négative de moins que le variant B, et à pH 3,0 une charge positive en moins. Ceci peut sembler en contradiction

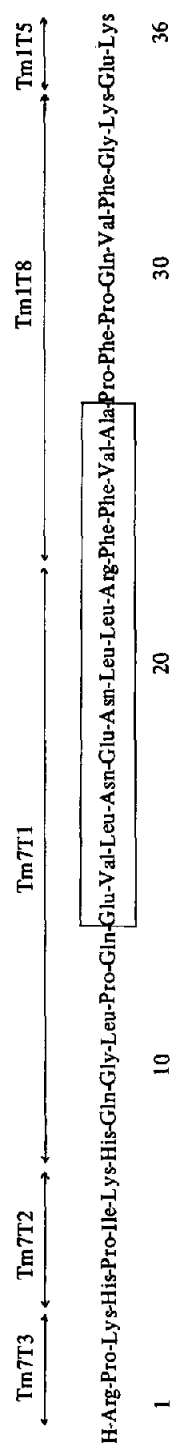


Fig. 2. Séquence des acides aminés et peptides tryptiques de la partie NH<sub>2</sub>-terminale de la caséine  $\alpha_{s1}$ B ou C bovine [4]; en encadré, délétion de 13 résidus d'acides aminés caractérisant le variant A.

avec le fait que la mobilité du variant A est plus élevée que celle du variant B en électrophorèse en gel avec urée, à chacun de ces deux pH. On se souviendra cependant que, de manière générale, la mobilité électrophorétique est proportionnelle au quotient de la charge nette par un facteur de dimension moléculaire; or, on peut vérifier que le quotient de la charge nette par le nombre de résidus est plus élevé pour  $\alpha_{s1}$  A que pour  $\alpha_{s1}$  B — et  $\alpha_{s1}$  C d'ailleurs — aussi bien à pH 8,5 qu'à pH 3,0, ce qui peut suffire à rendre compte de la mobilité relative de ces variants en électrophorèse. Rappelons par ailleurs que les propriétés physico-chimiques du variant A sont assez différentes de celles des autres variants [11, 15].

### Remerciements

L'analyse au spectromètre de masse du peptide CN<sub>6</sub>A T1Th1 a été effectuée par M.B.C.Das, dans le service du Professeur E.Lederer, à l'Institut de Chimie des Substances Naturelles, C.N.R.S., Gif-sur-Yvette. Nous remercions vivement MM. Das et Lederer de leur aide.

### Références

- [1] F.Grosclaude, J.C.Mercier et B.Ribadeau-Dumans, *European J. Biochem.* 14 (1970) 98.
- [2] J.C.Mercier, F.Grosclaude et B.Ribadeau-Dumas, *European J. Biochem.* 14 (1970) 108.
- [3] J.C.Mercier, F.Grosclaude et B.Ribadeau-Dumas, *European J. Biochem.*, sous presse.
- [4] F.Grosclaude, J.C.Mercier et B.Ribadeau-Dumas, *European J. Biochem.*, sous presse.
- [5] J.C.Mercier, F.Grosclaude et B.Ribadeau-Dumas, *European J. Biochem.*, sous presse.
- [6] M.P.Thompson, C.A.Kiddy, L.Pepper et C.A.Zittle, *Nature* 195 (1962) 1001.
- [7] F.Grosclaude, J.Pujolle, J.Garnier et B.Ribadeau-Dumas, *Ann. Biol. Animale Biochim. Biophys.* 6 (1966) 215.
- [8] F.Grosclaude, J.C.Mercier et B.Ribadeau-Dumas, *C.R. Hebd. Séances Acad. Sci. (Paris)* 268 (1969) 3133.
- [9] P.J.de Koning et P.J.van Rooijen, *Nature* 213 (1967) 1028.
- [10] E.B.Kalan, R.Greenberg et M.P.Thompson, *Arch. Biochem. Biophys.* 115 (1966) 468.
- [11] M.P.Thompson, H.M.Farrel Jr. et R.Greenberg, *Comp. Biochem. Physiol.* 28 (1969) 471.
- [12] M.P.Thompson et C.A.Kiddy, *J.Dairy Sci.* 47 (1964) 626.
- [13] E.Vilkas et E.Lederer, *Tetrahedron Letters* (1968) 3089.
- [14] D.W.Thomas, *FEBS Letters* 5 (1969) 53.
- [15] M.P.Thompson, W.G.Gordon, R.T.Boswell et H.M.Farrel Jr., *J.Dairy Sci.* 52 (1969) 1166.