

PREMIERS ELEMENTS DE STRUCTURE PRIMAIRE DES CASEINES α_{s2} BOVINES

Ghislaine BRIGNON, Bruno RIBADEAU DUMAS and Jean-Claude MERCIER

Laboratoire de Recherches sur les Protéines, I.N.R.A.; C.N.R.Z., 78350 Jouy-en-Josas, France

Received 27 September 1976

SUMMARY

The bovine α_{s2} -, α_{s3} -, α_{s4} - and α_{s6} -caseins [1] were isolated. The 4 proteins had the same amino-acid composition and C-terminal sequence, but different phosphorus contents. From a mixture of these proteins (designated as ' α_{s2} -complex') and from α_{s3} -casein a single and identical N-terminal sequence was obtained by Edman degradation. It seems therefore that the 4 proteins have the same peptide chain and only differ in their phosphorus content. For this reason we propose to modify the nomenclature of Annan and Manson [1] and to use in future the single term α_{s2} to designate the caseins which have been previously called α_{s2} , α_{s3} , α_{s4} and α_{s6} by these authors. The study of the primary structure of the peptide chain, which has confirmed these results, was undertaken on the S-carboxymethylated α_{s2} -complex. From a cyanogen bromide digest and from a tryptic hydrolyzate of the α_{s2} -complex, 5 and 25 peptides were obtained respectively, both sets of peptides accounting for the whole peptide chain. Examination of the tryptic peptides containing methionine combined with the N- and C-terminal sequences of the α_{s2} -complex and some CNBr peptides, gave the order of the CNBr peptides, H.CN4-CN2-CN5-CN1-CN3.OH, which contain 4, 22, 115, 49 and 17 residues respectively. A partial sequence accounting for half of the peptide chain of the α_{s2} -complex is given. This peptide chain is likely composed of 207 amino-acid residues

1. Introduction

Le groupe des caséines α_s bovines a fait l'objet d'une étude approfondie en 1969. Dans ce travail, Annan et Manson [1] ont montré que ce groupe était constitué d'au moins 6 protéines qu'ils ont dénotées α_{s0} à α_{s6} . Jusqu'alors les fractions α_{s3} et α_{s4} de Annan et Manson avaient été dénommées respectivement α_{s2} et α_{s3} selon la proposition du Comité de Nomenclature des Protéines du Lait en 1965 [2]. Nous utiliserons en fait, tout au long de cet article, la nomenclature de Annan et Manson [1] qui apparaissait plus appropriée au début de notre travail. La caséine α_{s1} est maintenant bien connue. Sa structure primaire a été élucidée par Mercier et al. [3]; ses variants génétiques sont parfaitement caractérisés [4]. Le composant α_{s0} semble très voisin de la caséine α_{s1} [1,5].

Nous avons déjà isolé en 1968 les caséines α_{s3} et α_{s4} , proposé pour chacune d'elle la même séquence C-terminale Leu-Tyr. OH [6], déterminé leurs masses moléculaires et leurs compositions en acides aminés

[7]. Ces masses moléculaires et ces compositions paraissaient identiques. En 1971, Hoagland et al. [8] isolaient les composants α_{s3} , α_{s4} , et α_{s5} . Pour les deux premiers, les masses moléculaires et les compositions en acides aminés qu'ils déterminaient étaient très voisines de nos résultats. Ils montraient en outre que la caséine α_{s5} donnait par réduction les composants α_{s3} et α_{s4} en quantités apparemment équimoléculaires. Ils en concluaient que la fraction α_{s5} était composée d'une molécule de caséine α_{s3} liée à une molécule de caséine α_{s4} par au moins une liaison disulfure. Un certain nombre de propriétés intéressantes de la caséine α_{s5} ont été décrites par Toma et Nakai en 1973 [9]: cette protéine, qui est plus sensible au calcium que la caséine α_{s1} , est stabilisée par caséine κ vis à vis des ions calcium, mais à un degré moindre que la caséine α_{s1} .

Dans cet article nous rapportons l'isolement des composés α_{s2} , α_{s3} , α_{s4} et α_{s6} , la détermination de leur composition en acides aminés et de leur teneur en phosphore, et les premiers éléments de leur structure primaire. Ceux-ci ont été obtenus à

partir d'un mélange des 4 constituants qui, comme nous le verrons, ont une structure primaire apparemment identique.

2. Matériel et méthodes

La caséine totale a été obtenue à partir d'une seule vache de race Française Frisonne Pie Noire, homozygote pour le complexe génique α_{s1} Cn^B- β -CnA1- κ Cn^B, par précipitation isoélectrique du lait écrémé. Les 2.2 kg de caséin humide ainsi obtenus à partir de 20 litre de lait ont été traités selon la première étape de la technique de Zittle et Custer [10] habituellement utilisée pour la préparation de la caséine κ . Le précipité obtenu, à pH 1.3–1.5, en présence d'acide sulfurique et d'urée 2 M a été dissous dans 10 litres d'urée 6.6 M et le pH ajusté à 4.7, avec de la soude concentrée. La concentration en urée a été réduite à 3.3 M par addition d'eau distillée et le précipité obtenu (complexe α_s), récupéré par centrifugation. L'opération a été répétée une fois (dissolution du précipité en urée 6.6 M, dilution à 3.3 M, centrifugation) [11]. Le précipité final (complexe α_s brut) a été dissous dans 2 litres d'urée 6.6 M avec ajustement du pH à 7.0 avec NaOH et dialysé. Un volume égal d'éthanol absolu a été ajouté à la solution dialysée, puis, goutte à goutte, une solution d'acétate d'ammonium 2 M dans l'éthanol à 50% jusqu'à obtention d'un précipité [11]. Celui-ci a été recueilli par centrifugation et dissous dans un minimum d'urée 6.6 M. La solution a été dialysée et lyophilisée. On a ainsi obtenu 32 g de complexe α_{s2} brut, débarrassé des caséines κ et β et de la plus grande partie des caséines α_{s1} et α_{s0} . 4.4 g de cette fraction ont été ensuite chromatographiés sur colonne de DEAE-cellulose microgranulaire selon Mercier et al. [12]. Six fractions ont été recueillies, correspondant aux caséines α_{s6} , α_{s4} , α_{s3} , α_{s2} , α_{s1} et α_{s0} . On a obtenu respectivement 140 mg, 600 mg, 800 mg, 550 mg, 700 mg et 300 mg de ces caséines après dialyse et lyophilisation. Les 4 premières n'étant qu'assez exceptionnellement bien séparées, on les a souvent rassemblées. Ce mélange sera appelé 'complexe α_{s2} ' dans le texte.

Les électrophorèses en gel d'amidon ont été réalisées à pH alcalin selon Schmidt [13] et à pH

acide selon Peterson et Kopfler [14]. Les techniques d'hydrolyse par le bromure de cyanogène [15], la trypsine [16], les exopeptidases [17], d'électrophorèse et chromatographie sur papier, de chromatographies sur colonnes de Dowex 50 ou de Sephadex ont été précédemment décrites [16]. Les hydrazinolyses ont été effectuées selon Fraenkel-Conrat et Chung Ming Tsung [18].

Les protéines utilisées pour les études de séquence ont été réduites et *S*-carboxyméthylées selon Woychik [19].

Les techniques d'hydrolyse acide et d'analyse d'acides aminés ont été décrites antérieurement [16]. Dans le cas de protéines ou de gros peptides les compositions ont été déterminées à partir de 3 temps d'hydrolyse (24, 48 et 96 h). Le tryptophane a été dosé selon Spies [20] après hydrolyse pronasique, et la phosphore, selon Bamann et al. [21].

Une partie des travaux de séquence a été effectuée à l'aide d'un Sequenator Beckman 890 B, comme décrit antérieurement [22].

La technique de dégradation d'Edman manuelle que nous avons utilisée est proche de celle mise en oeuvre dans le Sequenator. Elle a été décrite en détail par Mercier et al. [23].

3. Résultats

3.1. Propriétés générales des différents composants du complexe α_{s2}

Les caséines α_{s2} , α_{s3} , α_{s4} et α_{s6} obtenues après chromatographie sur DEAE-cellulose (fig.1) étaient homogènes par électrophorèse sur gel à pH alcalin ou acide.

La carboxypeptidase A libérait des 4 composants les mêmes acides aminés, leucine et tyrosine, en quantités équimolaires. Leurs masses moléculaires, calculées en admettant la libération d'une mole de chacun de ces acides aminés par mole de protéine, étaient toutes voisines de 26 000 daltons. L'action combinée des carboxypeptidases A et B libérait de chacun d'entre eux les mêmes acides aminés, Leu, Val, Tyr₂, Arg, pour la masse moléculaire indiquée précédemment. Les compositions en acides aminés et la teneur en phosphore des 4 caséines sont représentées dans le tableau 1. Des cartes peptidiques

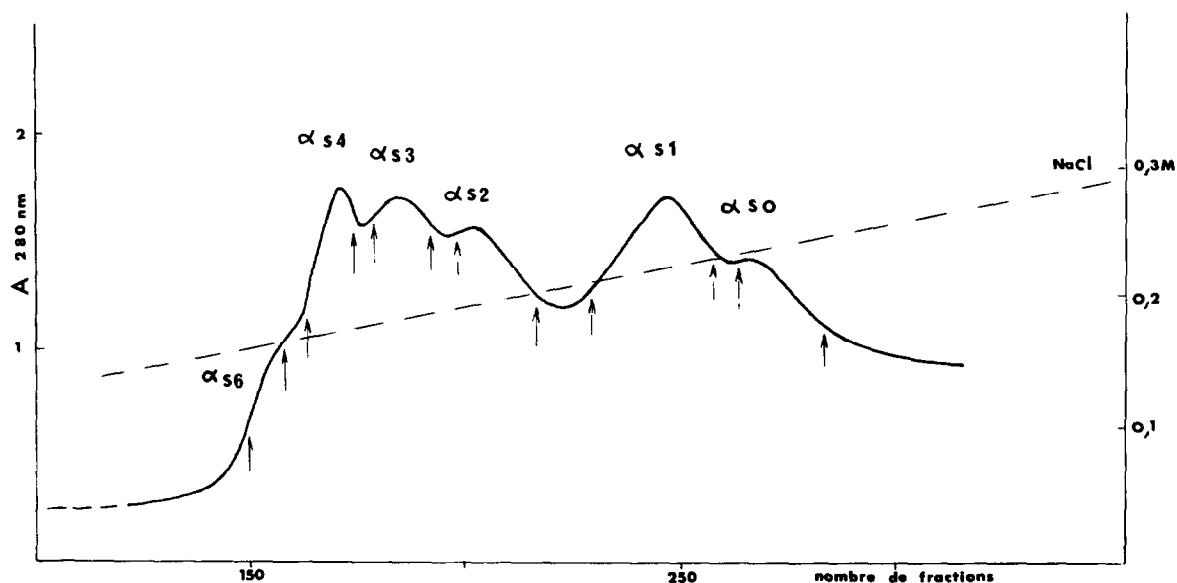


Fig.1. Diagramme de chromatographie sur DEAE-cellulose du complexe α_{s2} brut. Colonne de DEAE-cellulose microgranulaire de 6×15 cm; 4.4 g de complexe α_{s2} brut; tampon imidazole 0.01 M HCl, urée 3.3 M, 2-mercaptoéthanol 0.8%, pH 7.0; débit 100 ml/h; fractions de 14 ml; température ambiante; élution par gradient linéaire de molarité en NaCl (0.1 à 0.3 M; 2×3 litres).

Tableau 1
Composition en acides aminés des caséines du complexe α_{s2} non *S*-carboxyméthylées
(Moles d'acides aminés/mol de protéine)

Acide aminé	Caséine α_{s2}	Caséine α_{s3}	Caséine α_{s4}	Caséine α_{s6}	Séquence
Asp	18.14	18.18	18.40	18.48	18
Thr	14.07	14.85	14.92	14.81	15
Ser	14.29	14.35	13.89	14.63	17
Glu	41.13	40.80	40.39	41.70	40
Pro	10.57	10.36	9.96	10.11	10
Gly	2.65	2.29	2.40	2.38	2
Ala	8.23	8.29	8.15	7.97	8
1/2 Cys	—	—	—	—	2
Val	13.70	13.70	14.00	13.71	14
Met	3.91	4.09	4.43	3.54	4
Ile	10.64	10.36	10.87	10.31	11
Leu	13.96	13.81	14.16	13.59	13
Tyr	10.15	10.91	12.22	12.14	12
Phe	5.88	5.92	6.19	6.31	6
Lys	23.52	24.11	23.53	22.85	24
His	3.18	3.07	3.73	3.00	3
Arg	6.08	5.96	6.14	5.76	6
Trp	2.01	2.08	2.04	—	2
					207
P	13.14	12.42	11.25	10.23	—

Moyennes des résultats obtenus à partir de 3×3 temps d'hydrolyse (24, 48, 96 h). Les résultats obtenus pour Ser et Thr ont été extrapolés au temps 0. Les chiffres correspondant au temps d'hydrolyse de 96 h ont été retenus pour Ile et Val. La cystéine n'a pas été dosée. Le tryptophane et le phosphore ont été dosés séparément.

d'hydrolysats tryptiques des 4 caséines, réduites et *S*-carboxyméthylées, n'indiquaient pas de différence apparente.

Au vu de tous ces résultats, qui indiquaient une identité probable des 4 chaînes peptidiques, les études séquentielles ont été effectuées sur le complexe α_{s2} total. L'analyse séquentielle automatique de ce complexe n'a révélé qu'une séquence N-terminale unique: Lys-Asn-Thr-Met-Glu-His-Val-Ser-Ser-Ser-Glu-Glu. Une séquence identique a été trouvée dans les mêmes conditions pour le caséine α_{s3} isolée.

3.2. Hydrolyse du complexe α_{s2} par le bromure de cyanogène

L'hydrolysats obtenu a été desséché et repris par un tampon de pH 1.9 (acide acétique/acide

formique/eau; 87:25:888, v/v/v). La fraction insoluble ne renfermait qu'un peptide de 115 résidus, CN5, présent à différents degrés de phosphorylation. Par chromatographie de la fraction soluble sur Sephadex G 25, 4 peptides, CN1 à CN4, contenant respectivement 49, 22, 17 et 4 résidus ont été obtenus (tableau 2). Le peptide CN2 était présent à différents degrés de phosphorylation. Les éléments de séquence déterminés directement sur les 5 peptides CNBr, dont l'ensemble correspond à la totalité de la chaîne peptidique, sont représentés dans la figure 2. Combinés aux résultats obtenus sur la molécule entière, ils permettent d'obtenir l'enchaînement partiel des peptides CNBr: H.CN4-CN2-(CN5, CN1)-CN3.OH.

3.3. Hydrolyse tryptique du complexe α_{s2}

Par chromatographie d'un hydrolysats tryptique

Tableau 2
Composition en acides aminés des peptides obtenus après action du bromure de cyanogène sur le complexe α_{s2} (moles d'acides aminés/mol de peptide)

Acide aminé	CN1	CN2	CN3	CN4	CN5 ^b	Somme
Asp	2.20 (2)	1.05 (1)	—	1.01 (1)	13.32 (14) ^c	18
Thr	4.51 (5)	0.93 (1)	0.87 (1)	0.89 (1)	7.02 (7)	15
Ser	1.37 (2) ^c	4.01 (5) ^c	—	—	9.03 (10) ^c	17
Glu(+HSer)	10.46 (10)	7.48 (7)	1.14 (1)	0.48 (0)	25.58 (22) ^c	40
Pro	1.14 (1)	—	2.85 (3)	—	5.32 (6) ^c	10
Gly	—	—	—	—	2.11 (2)	2
Ala	1.90 (2)	—	—	—	5.74 (6)	8
SCM-Cys	—	—	—	—	— (2) ^c	2
Val	2.01 (2)	0.98 (1)	^a 1.99 (2)	—	^a 8.88 (9)	14
Met ¹	— (1)	— (1)	—	— (1)	— (1)	4
Ile	1.06 (1)	^a 1.79 (2)	^a 1.82 (2)	—	^a 6.38 (6)	11
Leu	5.00 (5)	—	0.97 (1)	—	6.97 (7)	13
Tyr	2.44 (3)	0.57 (1)	1.54 (2)	—	6.51 (6) ^c	12
Phe	2.84 (3)	—	—	—	2.95 (3)	6
Lys	8.81 (9)	2.01 (2)	2.84 (3)	0.98 (1)	10.22 (9) ^c	24
His	0.86 (1)	0.96 (1)	—	—	1.54 (1) ^c	3
Arg	2.07 (2)	—	0.90 (1)	—	2.86 (3)	6
Trp	—	—	— (1)	—	— (1)	2
Nombre de résidus	49	22	17	4	115	207
Phosphore	+	+	—	—	+	

¹ Met transformé en homosérine-homosérine lactone

^a hydrolyse de 96 h.

^b moyennes correspondant à 3 × 3 temps d'hydrolyse (24, 48, 96 h.) Ser et Thr extrapolés au temps 0. Dans les autres cas on n'a pas tenu compte de la destruction de Ser et Thr pendant l'hydrolyse de 24 h

^c chiffres entre parenthèses confirmés par analyse de fragments des peptides en question

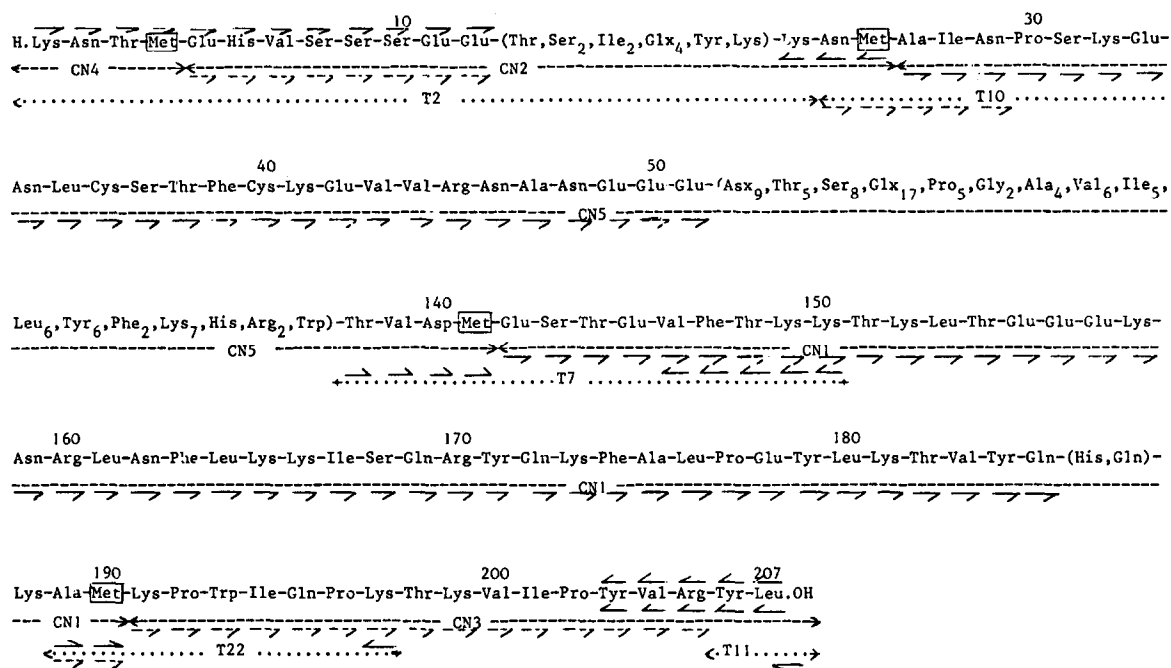
Structure primaire partielle de la chaîne peptidique des caséines α_2 .

Fig. 2. Acides aminés libérés \longrightarrow par la leucine aminopeptidase, \longleftarrow par les carboxypeptidases A et B; séquences établies: \longrightarrow par dégradation automatique d'Edman, \dashrightarrow par dégradation manuelle d'Edman, \longleftarrow par hydrazinolyse.

sur Dowex 50, suivie, si nécessaire, de purifications par chromatographie sur Sephadex G25 et/ou par électrophorèse préparative sur papier, 37 peptides de compositions différentes en acides aminés ont été isolés à l'état pur. Certains d'entre eux étaient présents à plusieurs degrés de phosphorylation. Parmi ces 37 peptides, 25 correspondaient à la totalité de la chaîne peptidique. Les autres étaient constitués soit de 2 ou 3 de ces derniers peptides (hydrolyse trypsique incomplète) soit de l'un d'eux porteur d'un résidu lysyle C-terminal supplémentaire.

Dans un premier temps, seuls les peptides T2, T10, T7 et T22, qui renfermaient chacun un résidu méthionyle, ont été étudiés. Les éléments de séquence déterminés sur ces peptides sont représentés dans la figure 2. Le peptide T2 représente l'extrémité N-terminale de la molécule et fait donc la jonction entre CN4 et CN2. Le peptide T10 fait la jonction entre CN2 et CN5. L'enchaînement complet des peptides CNBr est donc nécessairement: H.CN4-CN2-

CN5-CN1-CN3.OH. L'étude de l'extrémité N-terminale de T7 indique que ce peptide fait la jonction entre CN5 et CN1. La connaissance de la séquence N-terminale de T22, de sa composition en acides aminés et de la séquence complète de CN3 démontre que T22 fait la jonction entre CN1 et CN3.

La séquence du dipeptide C-terminal, T11, Tyr-Leu, a été établie par hydrazinolyse.

4. Discussion

La chaîne peptidique des caséines α_2 renferme 207 résidus d'acides aminés. Son résidu lysyle- N-terminal avait été observé il y a déjà longtemps en position N-terminale des caséines α et α_s à côté de l'arginine [24-26]. On sait maintenant que les préparations ainsi nommées renferment les caséines α_{s2} et α_{s1} . De même Waugh et al. [27] avaient noté en 1962 la libération de Trp, Leu et Tyr par la carboxypeptidase A à partir de la fraction dénotée

alors $\alpha_{s1,2}$, que l'on sait maintenant contenir, outre la caséine α_{s1} (de séquence C-terminale Leu-Trp.OH), une partie du complexe α_{s2} (de séquence C-terminale Tyr-Leu.OH). La séquence C-terminale Leu-Tyr rapportée par nous précédemment pour les caséines α_{s3} et α_{s4} [6] s'est révélée inexacte.

On peut conclure du présent travail que les caséines α_{s2} , α_{s3} , α_{s4} et α_{s6} possèdent une chaîne peptidique identique. Elles seraient donc vraisemblablement synthétisées par un seul gène de structure et phosphorylées à différents degrés. Ce résultat a été récemment confirmé par Grosclaude et al. [28] à partir d'études génétiques portant sur des variants des caséines α_{s2} . Pour toutes ces raisons nous proposons de modifier la nomenclature de Annan et Manson [1] et d'utiliser le terme unique α_{s2} pour désigner les caséines appelées par ces auteurs α_{s2} , α_{s3} , α_{s4} et α_{s6} , et tout autre caséine de même chaîne peptidique qui pourrait être découverte par la suite.

References

- [1] Annan, W. D. and Manson, W. (1969) *J. Dairy Res.* 36, 259–268.
- [2] Thompson, M. P., Tarassuk, N. P., Jenness, R., Lillevik, H. A., Ashworth, U. S. and Rose, D. (1965) *J. Dairy Sci.* 48, 159–169.
- [3] Mercier, J.-C., Grosclaude, F. and Ribadeau Dumas, B. (1971) *Eur. J. Biochem.* 23, 41–51.
- [4] Grosclaude, F., Mahé, M.-F., Mercier, J.-C. and Ribadeau Dumas, B. (1972) *Eur. J. Biochem.* 26, 328–337.
- [5] Manson, W., Annan, W. D. and Barnes, G. K. (1976) *J. Dairy Res.* 43, 133–136.
- [6] Ribadeau Dumas, B. (1968) *Biochim. Biophys. Acta* 168, 274–281.
- [7] Ribadeau Dumas, B. (1970) Thèse, Orsay, France.
- [8] Hoagland, P. D., Thompson, M. P. and Kalan, E. B. (1971) *J. Dairy Sci.* 54, 1103–1110.
- [9] Toma, S. J. and Nakai, S. (1973) *J. Dairy Sci.* 56, 1559–1562.
- [10] Zittle, C. A. and Custer, J. H. (1963) *J. Dairy Sci.* 46, 1183–1188.
- [11] Thompson, M. P. and Kiddy, C. A. (1964) *J. Dairy Sci.* 47, 626–632.
- [12] Mercier, J.-C., Maubois, J.-L., Poznanski, S. and Ribadeau Dumas, B. (1968) *Bull. Soc. Chim. Biol.* 521–530.
- [13] Schmidt, D. G. (1964) *Biochim. Biophys. Acta* 90, 411–414.
- [14] Peterson, R. F. and Kopfler, F. C. (1966) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 22, 388–392.
- [15] Ribadeau Dumas, B., Grosclaude, F. and Mercier, J.-C. (1970) *Eur. J. Biochem.* 14, 451–459.
- [16] Grosclaude, F., Mercier, J.-C. and Ribadeau Dumas, B. (1970) *Eur. J. Biochem.* 14, 98–107.
- [17] Mercier, J.-C., Grosclaude, F. and Ribadeau Dumas, B. (1970) *Eur. J. Biochem.* 14, 108–119.
- [18] Fraenkel-Conrat, H. and Chung Ming Tsung (1967) *Methods Enzymol.* 11, 151–155.
- [19] Woychik, J. H. (1965) *Arch. Biochem. Biophys.* 109, 542.
- [20] Spies, J. (1967) *Anal. Chem.* 39, 1412–1416.
- [21] Bamann, E., Novotny, E. and Rohr, L. (1948) *Chem. Ber.* 81, 438.
- [22] Addeo, T., Mercier, J.-C. and Ribadeau Dumas, B. (1976) *FEBS Lett.* 63, 255–259.
- [23] Mercier, J.-C., Addeo, F. and Pélissier, J.-P. (1976) *Biochimie. Soumis pour publication.*
- [24] Wissmann, H. and Nitschmann, H. S. (1957) *Helv. Chim. Acta* 40, 356.
- [25] Mellon, E. F., Korn, A. H. and Hoover, S. R. (1953) *J. Am. Chem. Soc.* 75, 1675.
- [26] Manson, W., (1961) *Arch. Biochem. Biophys.* 95, 336–342.
- [27] Waugh, D. F., Ludwig, M. L., Gillepsie, J. M., Melton, B., Foley, M. and Kleiner, E. (1962) *J. Amer. Chem. Soc.* 84, 4929–4938.
- [28] Grosclaude, F., Mahé, M.-F., Mercier, J.-C., Bonnemaire, J. and Teissier, J. H. (1976) *Ann. Gén. Sél. Anim., en préparation.*