

CHROM. 17 677

ÉLECTROPHORÈSE D'AFFINITÉ EN GEL DE POLYACRYLAMIDE

INFLUENCE DE LA CONCENTRATION DU GEL SUR L'AFFINITÉ APPARENTE DE LA CHOLINESTÉRASE POUR UN LIGAND DE SON SITE ANIONIQUE

PATRICK MASSON* et BERNARD MARNOT

Centre de Recherches du Service de Santé des Armées, Division de Chimie et Pharmacologie, 108 boulevard Pinel, 69275 Lyon Cedex 03 (France)

(Reçu le 14 janvier 1985)

SUMMARY

Affinity electrophoresis in polyacrylamide gel. Influence of the gel concentration on the apparent affinity of cholinesterase for an anionic site ligand

Affinity electrophoresis of three purified molecular forms of human plasma cholinesterase (monomer C₁, dimer C₃, tetramer C₄) was carried out in polyacrylamide gels at various total acrylamide concentrations ranging from 3.48 to 9% in a discontinuous buffer system. A water-soluble linear copolymer supporting procainamide, a ligand of the anionic site of cholinesterase, was physically entrapped at various concentrations within the gel network.

The combined effects of gel concentration and ligand concentration on the affinity pattern of the three molecular forms were studied. It was found that gel concentration influences the apparent binding activity of their anionic site:

The apparent strength of interaction varied with the gel concentration: the denser the gel was, the higher the apparent affinity.

The ligand-induced isomerization process was also depending on the gel concentration: the ligand concentration from which each zone is splitting into two moving zones decreased as the total gel concentration increased.

These results show that the electrophoretic matrix plays an important role in the affinity process in affinity electrophoresis presumably by controlling kinetic effects: kinetics of protein-ligand complex formation and dissociation reactions, and mass transfer kinetics.

INTRODUCTION

L'électrophorèse d'affinité en gel de polyacrylamide permet une approche quantitative des interactions protéine-ligand^{1,2}. Appliquée à l'étude de la cholinestérase du plasma humain (EC 3.1.1.8, butyrylcholinestérase, BuChE), elle nous a

permis d'appréhender un des aspects du fonctionnement du sous-site anionique du centre actif de cette enzyme³, de caractériser certaines de ses variantes génétiques⁴ et de mettre en évidence une altération des propriétés de son site anionique après inhibition par un organophosphoré⁵.

La théorie de l'électrophorèse d'affinité, dans son état actuel, ne permet pas de décrire ou d'interpréter la totalité des phénomènes observés. En particulier, des paramètres tels que l'intensité du champ électrique, la force ionique du tampon, la nature du polymère porteur du ligand ou le type de matrice électrophorétique, contrôlent l'affinité apparente des protéines pour les ligands libres ou immobilisés, sans qu'il soit possible de quantifier ni même de prévoir leurs effets. Des résultats obtenus dans un travail précédent³ suggéraient que la concentration du gel de polyacrylamide exerce aussi une influence sur l'affinité apparente de la cholinestérase pour un ligand immobilisé dans la matrice. Aussi, nous avons entrepris d'explorer l'effet de la concentration du gel sur l'affinité de cette enzyme pour un dérivé macromoléculaire de la procaïnamide, emprisonné dans des gels de polyacrylamide de porosité variable.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Préparation enzymatique

La BuChE a été purifiée à partir d'un pool de plasma humain selon un protocole comportant des précipitations fractionnées suivies de chromatographies d'échange d'ions et d'affinité⁵. La préparation titrant 217 U mg^{-1} [1 U correspond à la quantité d'enzyme hydrolysant $1 \mu\text{mol min}^{-1}$ d'iodure de butyrylthiocholine (1 mM) à 25°C en tampon phosphate $0,1 \text{ M}$, pH 7 (ref. 6)] était électrophorétiquement pure. Après électrophorèse en gel de polyacrylamide ($T = 6\%$, $C = 3,44\%$)*⁷ et coloration argentique⁸, une seule zone, correspondant à la forme tétramérique (C_4) de l'enzyme, a été révélée. Les formes monomérique (C_1) et dimérique (C_3) présentes en faibles quantités n'ont été détectées qu'après coloration enzymatique⁹.

Électrophorèses d'affinité

Les électrophorèses d'affinité des formes C_1 , C_3 et C_4 de la BuChE ont été réalisées en gel de polyacrylamide dans un système multiphasique⁹ analogue au système alcalin d'Ornstein⁷ en utilisant, comme macroligand, un copolymère linéaire [poly(acrylamide-acide acrylique substitué)] porteur de la procaïnamide trappé dans le gel. La méthode de synthèse de ce macroligand ainsi que les conditions de préparation des gels et d'électrophorèse ont été détaillées dans un article précédent⁵. Toutefois, nous avons opéré à température constante (8°C) en cuve Uniscil UE4 thermostatée.

Pour apprécier l'influence de la concentration du gel sur les paramètres d'affinité des trois formes moléculaires de la BuChE, nous avons étudié les variations de la mobilité électrophorétique relative de ces enzymes en fonction de $T\%$ et en fonction de $[L]$, la concentration analytique en procaïnamide immobilisée dans le gel. Les migrations ont été effectuées à 12 concentrations différentes en acrylamide, comprises entre 3,48 et 9%, avec un taux de réticulation constant ($C = 3,44\%$) et à 12 con-

* $T\%$ représente la concentration totale en monomères acrylamide dans le gel: (acrylamide + Bis)/100 ml, et $C\% = \text{Bis}/T$.

centrations en ligand. Trois gammes de concentration $[L]$ correspondant aux domaines d'affinité respectifs des formes C_1 , C_3 et C_4 ont été couvertes: 150–3000 μM pour C_1 , 4–75 μM pour C_3 et 0,6–12,5 μM pour C_4 . Après révélation de l'activité cholinestérasique⁹, les gels ont été densitométrés⁴. Pour chaque concentration de gel, les constantes de dissociation apparentes (K_{Dapp}) des complexes enzyme-macroligand ont été déterminées graphiquement en utilisant la représentation de Takeo et Nakamura¹⁰.

$$R_{m_i}^{-1} = R_m^{-1} (1 + [L]/K_{Dapp}) \quad (1)$$

dans laquelle R_{m_i} et R_m désignent respectivement la mobilité relative de l'enzyme en présence et en absence de ligand dans un gel de concentration T donnée. Dans les gels d'affinité, chaque forme moléculaire de la BuChE passe progressivement d'un état initial A à un état B au-delà d'une concentration en ligand dite concentration de transition (L_t). Ce phénomène a été interprété comme le résultat d'une isomérisation des sites anioniques induite par la fixation du ligand entraînant l'augmentation de leur affinité ($K_{Dapp,B} < K_{Dapp,A}$) (ref. 3). Ce phénomène se manifeste dans des conditions de non-équilibre et nous avons émis l'hypothèse selon laquelle la durée de vie de l'état B doit être longue devant l'intervalle de temps qui sépare deux contacts efficaces entre l'enzyme et le ligand. Pour les raisons invoquées dans un article précédent⁵, seules les K_{Dapp} correspondant aux enzymes dans l'état A ont été déterminées.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

En l'absence de ligand, la mobilité d'une protéine dans un gel de polyacrylamide dépend de l'effet de tamisage moléculaire du gel et peut être décrite par le modèle semi-empirique de Rodbard et Chrambach¹¹:

$$R_m = R_{m_0} \exp [-c(\bar{R} + r)^2 T] \quad (2)$$

dans laquelle R_{m_0} représente la mobilité libre de la protéine ($T = 0$), \bar{R} son rayon moyen, r le rayon d'une fibre de polyacrylamide et c un facteur empirique dépendant des conditions expérimentales. Sous forme semi-logarithmique, cette relation est connue sous le nom d'équation de Ferguson:

$$\log_{10} R_m = \log_{10} R_{m_0} - K_R T \quad (3)$$

la pente de la droite [$K_R = c' (\bar{R} + r)^2$] ou coefficient de retardement est proportionnelle à la taille de la protéine, l'ordonnée à l'origine $\log_{10} R_{m_0}$, encore écrite $\log_{10} Y_0$ est fonction de la charge nette de la protéine rapportée à la surface. Dans un gel d'affinité, la mobilité va dépendre en plus de l'interaction entre la protéine et le ligand^{10,12} (eqn. 1). La différentielle de la mobilité relative (dR_m) d'une protéine migrant dans un gel d'affinité dans lequel L et T varient, est donc:

$$dR_m = \left(\frac{\partial R_m}{\partial T} \right)_L dT + \left(\frac{\partial R_m}{\partial L} \right)_T dL \quad (4)$$

Aussi, dans des gels d'affinité de concentration en acrylamide variable et en admettant que dans le milieu sans contrainte ($T = 0\%$) nous ayons R_{m_0} constant quelle que soit $[L]$, nous pouvons écrire:

$$R_{m_i} = R_{m_0} \exp [-\ln 10 K_R T] / (1 + [L]/K_{Dapp}) \quad (5)$$

avec pour condition physique $T > T_{oi}$ (T_{oi} est la concentration en acrylamide au-dessous de laquelle le macroligand n'est plus immobilisé³).

On peut établir une équivalence entre l'effet de T et l'effet de $[L]$ sur la mobilité. Plaçons-nous dans le cas où R_{m_i} est constant. On calcule alors dL/dT en différenciant la relation 5:

$$-\ln 10 K_R T = \ln \frac{R_{m_i}}{R_{m_0}} + \ln (1 + [L]/K_{Dapp}) \quad (6)$$

$$-\ln 10 K_R dT = \frac{d(1 + [L]/K_{Dapp})}{1 + [L]/K_{Dapp}} \quad (7)$$

soit:

$$\frac{dL}{dT} = -\ln 10 K_R K_{Dapp} (1 + [L]/K_{Dapp}) \quad (8)$$

Pour conserver R_{m_i} constante lorsqu'on ajoute une concentration $[L]$ de ligand immobilisé dans le gel, il faut abaisser la concentration en acrylamide T du gel, de ΔT . Sachant que:

$$dT = - \frac{dL/K_{Dapp}}{\ln 10 K_R (1 + [L]/K_{Dapp})} \quad (9)$$

après intégration entre 0 et $[L]$ on obtient:

$$\Delta T = - \frac{1}{\ln 10 K_R} \ln (1 + [L]/K_{Dapp}) \quad (10)$$

Les diagrammes de Ferguson (exemple, pour la forme C_1 : Fig. 1) confirment l'hypothèse selon laquelle la variation de $[L]$ n'affecte pas R_{m_0} . Ils montrent surtout le recul progressif des seuils d'exclusion T_e (T pour laquelle $\log_{10} 1000 R_{m_i} = 10$) et une augmentation apparente des $|K_R|$ lorsque $[L]$ croît. En termes géométriques, dans des gels ne contenant pas de ligand, de telles variations correspondraient à un accroissement de la taille des enzymes.

Si l'on considère $K_{R_i} = K_R + \Delta K_R$ (pente des diagrammes de Ferguson dans les gels d'affinité) comme une variable fonction de $[L]$ (cf. encadré de la Fig. 1), un raisonnement analogue au précédent peut être tenu; il conduit à:

$$\Delta K_R = - \frac{1}{\ln 10 T} \ln (1 + [L]/K_{Dapp}) \quad (11)$$

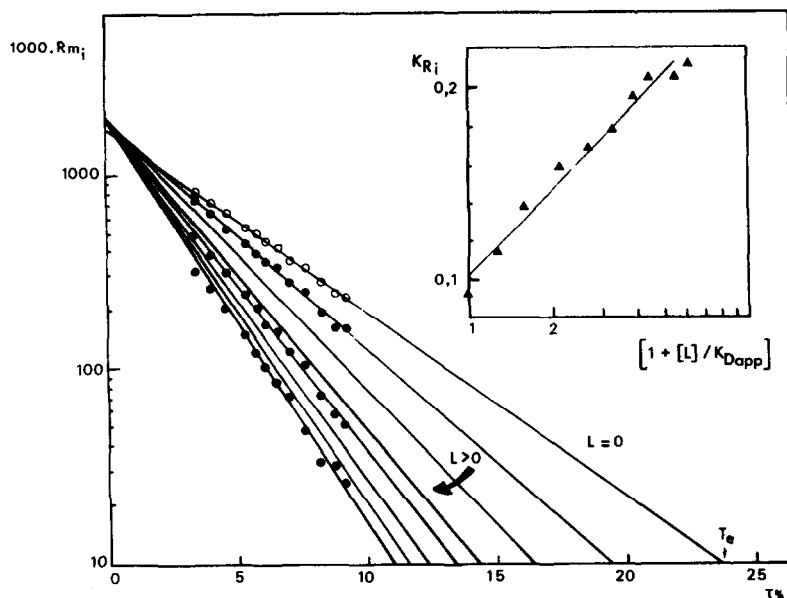


Fig. 1. Diagramme de Ferguson représentant la variation de la mobilité relative (R_m) de la forme C_1 en fonction de la concentration en acrylamide ($T\%$) pour $L = 0$ ($\log_{10} R_m = \log_{10} R_{m0} - K_R T$) et à des concentrations croissantes en ligand immobilisé. En encadré: variation de K_{R_i} en fonction de $\ln(1 + [L]/K_{Dapp})$.

et à la relation d'équivalence,

$$\Delta K_R T = \Delta T K_R \quad (12)$$

À partir de l'éqn. 10 ou 11, on peut prévoir la variation de K_{Dapp} en fonction de T :

$$K_{Dapp} = [L]/[\exp(-\ln 10 \Delta K_R T) - 1] \quad (13)$$

avec

$$\lim_{T \rightarrow 0} K_{Dapp} = -\infty$$

et

$$\lim_{T \rightarrow \infty} K_{Dapp} = K_{Dapp, \min} = -[L]$$

Dans la réalité, des limites physiques sont imposées par la structure du gel. Au dessous d'une concentration $T_\omega = 2.15\%^{13}$, l'effet de tamisage moléculaire ne se produit plus et la mobilité des trois formes de la cholinésterase devient virtuellement la même. En électrophorèse d'affinité, la nécessité d'immobiliser le macroligand constitue une contrainte supplémentaire impliquant de travailler à des concentrations en acrylamide supérieures à $T_{\omega i}$. Le seuil d'immobilisation du ligand $T_{\omega, i} > T_\omega$ est fonction de la taille et de la conformation du macroligand et de son interaction avec les chaînes de polyacrylamide. La limite supérieure est en pratique la concentration en acrylamide pour laquelle l'enzyme est exclue du gel (T_e).

Les représentations de Takeo et Nakamura pour les différentes concentrations T (Fig. 2) confirment que les K_{Dapp} des trois enzymes dépendent de T . Pour ces trois formes moléculaires, les droites de pente $\ln 10 K_R T / R_{m0} K_{Dapp}$ convergent vers un

point γ . L'ordonnée de ce point correspond à $R_{m_0}^{-1}$, l'ordonnée d'une droite de pente nulle obtenue théoriquement lorsque $T = 0$ (en pratique pour $T = T_{\omega,i}$). L'abscisse du point γ , $K_{Dapp} = -[L]$ correspond à la valeur minimale de K_{Dapp} (eqn. 13) atteinte lorsque $T = \infty$ (droite parallèle à l'axe des ordonnées).

Les coordonnées des points γ ont été déterminées graphiquement (Fig. 2). En ce qui concerne la forme C_4 qui migre peu, les mesures des distances de migration ont été imprécises; aussi les points d'intersection des droites $R_{m_i}^{-1} = f([L])$ sont relativement dispersés. Pour C_4 , le point γ est le point d'intersection des médianes des projections de ces points sur les deux axes. Les $R_{m_i}^{-1}$, estimés 1,3 pour C_1 , 1,7 pour C_3

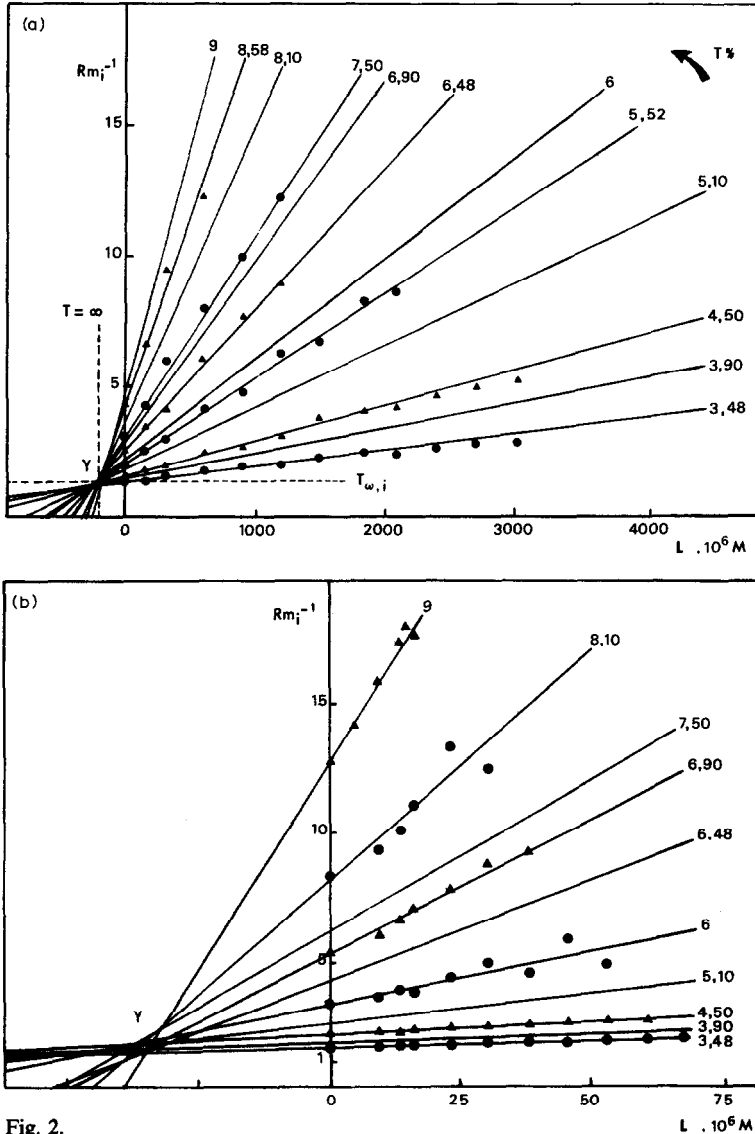


Fig. 2.

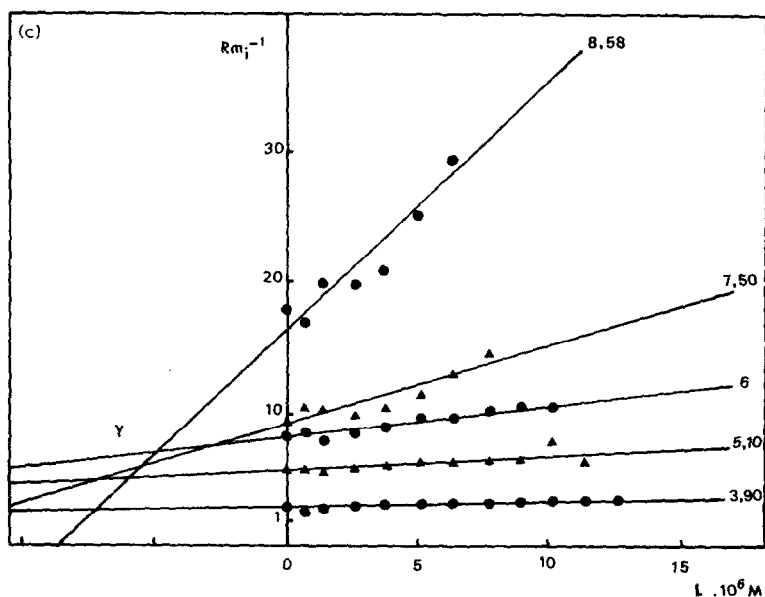


Fig. 2. Variation de l'inverse de la mobilité relative ($R_{m_i}^{-1}$) en fonction de la concentration en ligand immobilisé $[L]$ à différentes T %. (a) Forme C_1 , (b) forme C_3 , (c) forme C_4 .

et 2,5 pour C_4 , correspondent à la mobilité qu'auraient ces enzymes dans un gel d'affinité de $T_{w,i} \approx 3,40\%$. Les valeurs de $K_{Dapp,min}$, abscisses des points γ , sont indiquées dans le Tableau I. L'interaction entre les différentes formes moléculaires de la BuChE et la procainamide étant monovalente: 1 site sur n , ces constantes sont en réalité égales à K_{Dapp}/n (ref. 14).

Les variations des K_{Dapp} en fonction de T sont représentées dans la Fig. 3. Leurs valeurs limites $K_{Dapp,max}$ extrapolées à $T = 0$ ont été calculées par régression et figurent au Tableau I.

Les valeurs $K_{Dapp,min}$ indiquées sur la Fig. 3 par le symbole \star montrent que, dans nos conditions expérimentales, l'affinité maximale est, en fait, atteinte dès une concentration en acrylamide T_{opt} située entre 7 et 8% et ne varie pratiquement plus au-delà.

TABLEAU I

VALEURS EXTRÊMES DES CONSTANTES DE DISSOCIATION APPARENTES DES COMPLEXES BuChE (C_1 , C_3 , C_4)-PROCAÏNAMIDE

	n^*	$K_{Dapp} \cdot 10^6$ (M)** (a)	$nK_{Dapp} \cdot 10^6$ (M)	r	$K_{Dapp} \cdot 10^6$ (M)*** (b)	$nK_{Dapp} \cdot 10^6$ (M)	r^{\S}	a/b
C_1	1	2750	2750	1	200	200	1	13,75
C_3	2	589	1178	2,33	35	70	2,85	16,83
C_4	4	107	428	6,42	6,90	27,6	7,24	15,51

* Nombre de sites anioniques de chaque forme moléculaire.

** Valeurs des $K_{Dapp,max}$ extrapolées à $T = 0$ (Fig. 3).

*** Valeurs des $K_{Dapp,min}$ calculées à partir des coordonnées des points γ (Fig. 2).

\S Rapport $(K_{Dapp})_{monomère}/(K_{Dapp})_{n-mère}$.

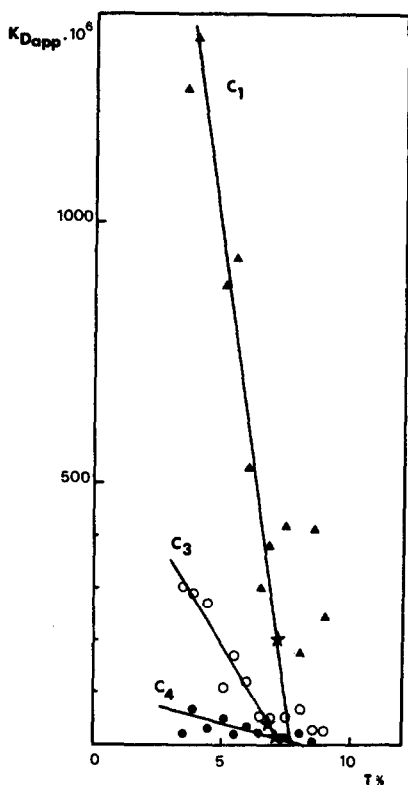


Fig. 3. Evolution de l'affinité apparente (K_{Dapp}) des trois formes moléculaires de la BuChE (état A) pour la procainamide immobilisée, en fonction de T %.

Par ailleurs, l'étude de la transition de la BuChE entre l'état initial A de basse affinité et l'état B de haute affinité montre, pour les trois enzymes, que la concentration de transition (L_t) est également fonction de T (Fig. 4). Plus la concentration en acrylamide est élevée, plus le seuil de transition est précoce.

L'effet de la concentration du gel sur le fonctionnement du site anionique de la BuChE ne semble dépendre ni du nombre de sous-unités, ni de l'affinité intrinsèque de celles-ci. Il se manifeste de façon identique pour les trois formes moléculaires: $K_{Dapp}(T=0)/K_{Dapp,min}$ est constant (cf. Tableau I, rapport a/b). Cet effet se produit dans des conditions de non-équilibre: enzyme migrant de façon unidirectionnelle vers le ligand immobilisé sous l'action du champ électrique et ne semble dépendre que de la structure du gel.

La structure du gel conditionne la répartition des molécules de ligand et leur accessibilité à l'enzyme; elle doit également contrôler les cinétiques de formation et de dissociation des complexes enzyme-ligand. Le gel peut aussi exercer des contraintes stériques sur l'enzyme et modifier en particulier la conformation de son centre actif. Ce type de contrainte semble cependant négligeable dans le cas présent. En effet, les trois formes moléculaires de la BuChE sont des isomères de taille et si de tels effets stériques se manifestaient, ils devraient être plus marqués pour le tétramère que pour les autres formes. On ne connaît pas la structure microscopique du réseau

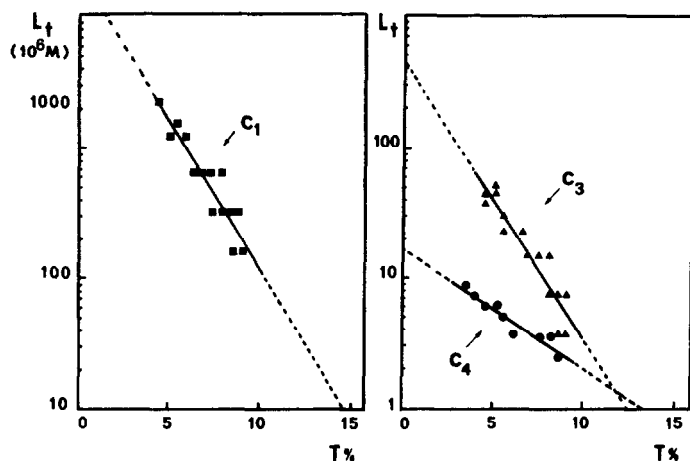


Fig. 4. Variation de la concentration en procainamide immobilisée (L_t), induisant le passage de l'enzyme (C_1 , C_3 ou C_4) de l'état initial A à l'état B, en fonction de T %.

constitué par l'enchevêtrement des fibres de polyacrylamide réticulées et des chaînes du macroligand. On suppose que les molécules de ligand sont réparties de façon homogène, mais l'existence d'essaims est très probable¹⁴. En effet, il a été observé* que certains macroligands rendent les gels opaques¹⁶ ou inhibent leur polymérisation¹⁷. Or Gelfi et Righetti¹⁸ ont montré que la turbidité des gels de polyacrylamide reflète une distribution hétérogène des chaînes de polyacrylamide en domaines de différentes densités. La formation de ces essaims altère l'homogénéité, la porosité et les propriétés de tamisage moléculaire des gels. Dans le cas des gels d'affinité, l'existence de ces essaims ou îlots va déterminer la concentration efficace en ligand dans le gel ($[L]_{\text{eff}} < [L]$) et, dans le cas de macroligands chargés, conditionner aussi l'importance des effets électrostatiques entre le support chargé et l'enzyme.

L'effet de la concentration du gel sur le seuil de transition L_t suggère, enfin, que l'hystérésis de la cholinestérase qui se manifeste au cours de l'électrophorèse d'affinité pourrait résulter non seulement d'un changement conformationnel rémanent de l'enzyme induit par le ligand mais aussi de contraintes diffusionnelles. Ce phénomène, uniquement observé dans un système non-équilibré, pourrait être à rapprocher des phénomènes d'hystérésis et d'oscillation, d'origine diffusionnelle, observés avec l'acétylcholinestérase greffée sur des membranes artificielles¹⁹. Il convient cependant de préciser que les contraintes diffusionnelles ont en général tendance à abaisser la force apparente des interactions protéine-ligand, alors que les effets électrostatiques dus à l'existence d'un gradient de potentiel entre la matrice et la phase mobile ont un effet inverse.

Sur la base de nos résultats expérimentaux, et malgré l'absence d'arguments théoriques, on peut dire, en conclusion, que la concentration du gel joue un rôle important dans le processus de l'interaction protéine-ligand en déterminant, d'une

* Certains copolymères porteurs de ligands cationiques de la cholinestérase (dibucaïne, amodiaquine, tacrine) inhibent la polymérisation du gel de polyacrylamide ou rendent les gels opaques lorsqu'ils sont incorporés en forte proportion¹⁵.

part, la vitesse de transfert de la protéine vers le ligand immobilisé, et en conditionnant d'autre part, les probabilités des événements aléatoires qui constituent la séquence temporelle des collisions avec ou sans interception entre la protéine et le ligand²⁰. L'effet global du gel est donc la somme de phénomènes complexes, certains pouvant être antagonistes, qu'il convient maintenant d'examiner dans le détail. Une tentative de modélisation est actuellement en cours d'élaboration dans notre laboratoire.

RÉSUMÉ

L'électrophorèse d'affinité en gel de polyacrylamide de trois formes moléculaires purifiées de la cholinestérase du plasma humain (monomère C₁, dimère C₃, tétramère C₄) a été réalisée en système multiphasique dans des gels dont la concentration totale en monomères acrylamide était comprise entre 3,48 et 9%. Un copolymère linéaire porteur de la procainamide, un ligand du site anionique de la cholinestérase, était emprisonné à différentes concentrations dans le gel.

Nous avons étudié les effets combinés de la concentration du gel et de la concentration du ligand sur l'affinité des trois formes moléculaires de la cholinestérase. Nous avons trouvé que la concentration du gel influence les propriétés du site anionique de ces enzymes:

La force apparente de l'interaction varie avec la concentration du gel: plus le gel est dense, plus l'affinité apparente est élevée.

Le processus d'isomérisation des sites anioniques induit par le ligand dépend aussi de la concentration du gel: la concentration en ligand à partir de laquelle chaque bande se divise en deux zones décroît lorsque la concentration du gel augmente.

Ces résultats montrent que la matrice électrophorétique joue un rôle important en électrophorèse d'affinité en contrôlant probablement d'une part, la cinétique de transfert et d'autre part la formation et la dissociation des complexes protéine-ligand.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 V. Hořejší, *Anal. Biochem.*, 112 (1981) 1.
- 2 K. Takeo, *Electrophoresis*, 5 (1984) 187.
- 3 P. Masson, A. Privat de Garilhe et P. Burnat, *Biochim. Biophys. Acta*, 701 (1982) 269.
- 4 P. Masson et P. Vallin, *J. Chromatogr.*, 273 (1983) 289.
- 5 P. Masson, B. Marnot, J.-Y. Lombard et P. Morelis, *Biochimie*, 66 (1984) 235.
- 6 G. L. Ellman, K. D. Courtney, V. Andres, Jr. et R. M. Featherstone, *Biochem. Pharmacol.*, 7 (1961) 88.
- 7 L. Ornstein, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 121 (1964) 321.
- 8 C. R. Merrill, D. Goldman, S. A. Sedman et M. H. Ebert, *Science*, 211 (1981) 1437.
- 9 P. Juul, *Clin. Chim. Acta*, 19 (1968) 205.
- 10 K. Takeo et S. Nakamura, *Arch. Biochem. Biophys.*, 153 (1972) 1.
- 11 D. Rodbard et A. Chrambach, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 65 (1970) 970.
- 12 V. Hořejší, *J. Chromatogr.*, 178 (1979) 1.
- 13 P. Masson, *Biochim. Biophys. Acta*, 578 (1979) 493.
- 14 V. Hořejší et M. Tichá, *J. Chromatogr.*, 216 (1981) 43.
- 15 P. Masson, résultats non publiés.
- 16 V. Hořejší, M. Tichá et J. Kocourek, *Biochim. Biophys. Acta*, 499 (1977) 290.
- 17 M. Tichá, V. Hořejší et J. Barthová, *Biochim. Biophys. Acta*, 534 (1978) 58.
- 18 C. Gelfi et P. G. Righetti, *Electrophoresis*, 2 (1981) 220.
- 19 A. Friboulet et D. Thomas, *Biophys. Chem.*, 16 (1982) 153.
- 20 V. Matoušek et V. Hořejší, *J. Chromatogr.*, 245 (1982) 271.