

PREPARATION MICROBIOLOGIQUE DU 2-CETO-3-DESOXY-D- GLUCONATE 1-¹⁴C OU U-¹⁴C,

J. Pouyssegur

Service de Microbiologie de l'Institut National des
Sciences Appliquées -69- VILLEURBANNE -France-.

Received on June 21, 1972.

SUMMARY

A E. Coli K 12 mutant having lost 2-keto-3-desoxy-gluconate kinase activity is unable to utilize glucuronate as a unique carbon source. However, this strain is able to partially convert glucuronate into KDG in resting cells conditions reported here.

A method is described making it possible to produce 1-¹⁴C-KDG or U-¹⁴C-KDG when the kinase cells metabolise 6-¹⁴C or U-¹⁴C-D-glucuronate. The radioactive KDG accumulated in the incubation medium has been purified thanks to a biological specific method followed by chromatography on anionic resin. The yield of the purified KDG from the hexuronate is about 20%. According to chromatographic criteria and specific conversion by KDG-kinase, the product obtained has been authenticated as true KDG.

RESUME

Une souche mutante d'E. Coli K 12 ayant perdu l'activité 2-céto-3-désoxy-gluconate kinase ne peut utiliser le glucuronate comme unique source carbonée. Cependant, des cellules non proliférantes de cette souche kinase sont capables dans certaines conditions rapportées ici, de métaboliser partiellement le glucuronate en KDG.

Nous décrivons une méthode qui permet de produire du KDG- $1-^{14}\text{C}$ ou $\text{U}-^{14}\text{C}$ lorsque les cellules kinase⁻ métabolisent du D-glucuronate- $6-^{14}\text{C}$ ou $\text{U}-^{14}\text{C}$. Le KDG radioactif excrété dans le milieu de culture a pu être purifié par une méthode biologique spécifique suivie d'une chromatographie sur résine anionique. Le rendement final du KDG purifié par rapport à l'hexuronate est de 20 %. Le produit obtenu par cette voie microbiologique a été identifié au KDG authentique sur la base de critères chromatographiques et de spécificité enzymatique.

INTRODUCTION

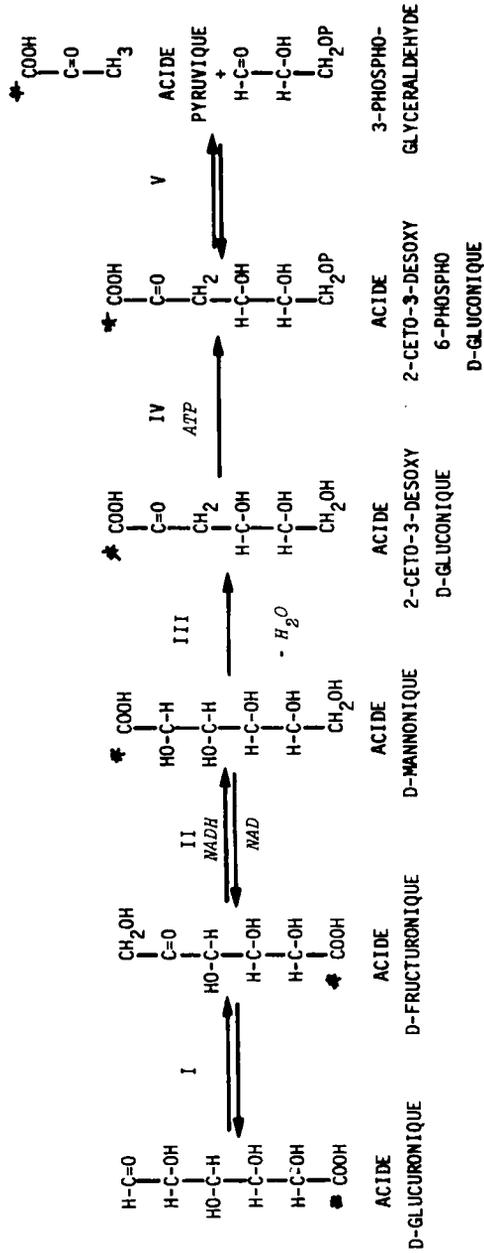
Le métabolisme des hexuronates chez E. Coli élucidé en 1960 par l'équipe d'Ashwell (1), a fait l'objet d'une étude physiologique et génétique depuis quelques années dans notre laboratoire. Or, le 2-céto-3-désoxygluconate (KDG) décrit jusqu'alors comme un intermédiaire de ce métabolisme (Fig. 1) est capable d'assurer la croissance d'E. Coli K 12 lorsque certains éléments régulateurs du régulon kdg sont mutés (2,3). De plus, certaines observations (4) nous ont permis de mettre en évidence l'existence d'une voie métabolique secondaire capable d'écouler le KDG. Il était donc indispensable à la fois pour l'étude de la KDG-perméase et l'élucidation des étapes de cette voie secondaire, de mettre au point une synthèse du KDG radioactif.

La méthode choisie et décrite ici, consiste à produire le KDG à l'aide de suspensions non proliférantes d'un mutant kinase⁻ métabolisant le D-glucuronate- $6-^{14}\text{C}$ ou $\text{U}-^{14}\text{C}$. Le KDG radioactif correspondant $1-^{14}\text{C}$ ou $\text{U}-^{14}\text{C}$ formé par l'action séquentielle des étapes enzymatiques I, II et III (Fig. 1) est excrété dans le milieu. Ce composé est ensuite purifié par une méthode microbiologique suivie d'une chromatographie sur résine anionique.

MATERIEL ET METHODES

-Souche bactérienne- La souche CAK 101 utilisée ici est dérivée d'E. Coli K 12 (Hfr P4X), auxotrophe pour la méthionine (collection d'E. Wollman, Institut Pasteur, Paris). Cette souche porte une mutation kinase⁻ (kdg K), une mutation

Figure 1



aldolase (kdg A) et une mutation dans le gène régulateur (kdg R^c) qui dérègle la KDC-perméase. Le mode d'obtention de cette souche a été décrit ailleurs (3). Cependant il convient de noter que si cette souche nous a donné un bon rendement de production de KDG, une souche kinase⁻ simple convient également pour cette synthèse.

-Précultures- Les précultures qui servent à la production de masse bactérienne pour les suspensions non-proliférantes sont réalisées en milieu minimum liquide du type M 63 (5), additionné de DL-méthionine (200 µg/ml), de thiamine (0,5µg/ml) et des substrats de croissance : glycérol (2 mg/ml) et d'induction : glucuronate (2 mg/ml). Ces précultures ensemencées à partir d'une culture de CAK 101 sur milieu complet, sont agitées en fioles coniques à 37°C pendant une nuit. La masse bactérienne est évaluée par turbidimétrie à 600 nm. Les cellules sont récoltées par centrifugation à +4°C et remises en suspension dans le milieu de production du KDG, à la densité bactérienne convenable (cf § résultats).

-Dosages divers- Le KDG est dosé colorimétriquement par la méthode très sensible de Varavdekar et Saslaw (6) modifiée par Weissbach et Hurwitz (7). Le coefficient d'extinction molaire à 549 nm, du complexe coloré, établi à partir du sel de potassium du KDG cristallisé est de $(85,5 \pm 2) \cdot 10^3$ (8). La mesure de radioactivité des solutions aqueuses des différentes étapes et des fractions collectées après passage sur colonne est effectuée par scintillation liquide dans un mélange toluène-éthanol (9:1, v/v) contenant 0,25 g/l de Diméthyl-POPOP et 5g/l de PPO. 10µl de chaque fraction sont ajoutés à 10 ml du mélange scintillant.

-Chromatographie- La séparation du D-glucuronate et du KDG est réalisée sur une colonne (2,5 x 14 cm) de résine anionique Dowex 1-X8, 200-400 mesh mise sous la forme Cl⁻ par passage d'un large excès d'HCl 1 N. Avant l'emploi, la colonne est lavée à l'eau déminéralisée jusqu'à un pH voisin de 6.

La chromatographie analytique en couche mince est réalisée sur support Gelman SG dans le système de solvant : benzène-chloroforme-acide acétique (40-20-40, v/v/v). La révélation des composés organiques est effectuée par H₂SO₄ concentré ou par le réactif periodate-thiobarbiturate (9) pour la révélation spécifique du KDG.

-Produits chimiques- Le sel de potassium du KDG- ^{12}C a été synthétisé selon une méthode enzymatique récemment décrite (8). Le D-gluconate- ^{12}C de potassium est de marque Sigma. Le D-gluconate- $6-^{14}C$ (3,6 Ci/mol) et $U-^{14}C$ (76 Ci/mol) provient du Radiochemical Centre (Amersham). Ces 2 composés d'une pureté de l'ordre de 9, % ont été utilisés sans purification préalable.

RESULTATS ET DISCUSSION

1- Caractéristiques de production du KDG

Lorsque l'on cultive une souche portant une mutation kinase⁻, sur glucose, glycérol ou milieu complet en présence d'un hexuronate (gluconate ou galacturonate), une forte excrétion de KDG est observée en fin de phase exponentielle. Ce composé est précisément le substrat de l'enzyme qui fait défaut chez cette souche. Le KDG produit dans ces conditions peut atteindre 25 % de l'hexuronate de départ. Si l'aération de la culture est poursuivie, la quantité de KDG diminue, pour atteindre une valeur pratiquement nulle après 24 h d'aération. Cette disparition n'est pas due à une instabilité du KDG dans le milieu de culture car, lorsqu'on aère le milieu de culture riche en KDG mais exempt de cellules, aucune baisse de la quantité de KDG initiale n'est observée. Cette disparition du KDG au cours du temps est vraisemblablement due à l'écoulement par les enzymes de la voie secondaire que nous avons évoquée dans l'introduction.

Nous avons recherché s'il était possible d'utiliser les cellules récoltées en fin de phase exponentielle et pré-induites pour les enzymes de la voie des hexuronates pour la synthèse du KDG dans des conditions de non prolifération. Pour cela, les cellules récoltées en fin de phase exponentielle ont été remises en suspension dans divers milieux salins, tamponnés ou non, additionnés de gluconate. Nous avons pu retenir, des divers facteurs de variation étudiés : que l'aération des cellules non proliférantes était nécessaire, que l'addition d'une source énergétique (glycérol) stimulait peu la vitesse de production et n'améliorait pas le rendement, et surtout que parmi tous les milieux testés, le plus simple d'entre-eux, NaCl $10^{-2}M$ permettait d'obtenir un rendement final maximum de l'ordre de 40 %. Par sa simplicité, ce milieu était donc très favorable à la purification du KDG excrété. Ce choix étant fait, nous avons ensuite recherché les conditions optimales de concentration en gluconate et en cellules. Pour une densité bactérienne de $1,2 \cdot 10^9$ cellules/ml, la vitesse de production de KDG (non représentée ici) est maximale pour une concentration de gluconate comprise entre 2 et 4 mg/ml. Cependant la

Figure : 2 a,b

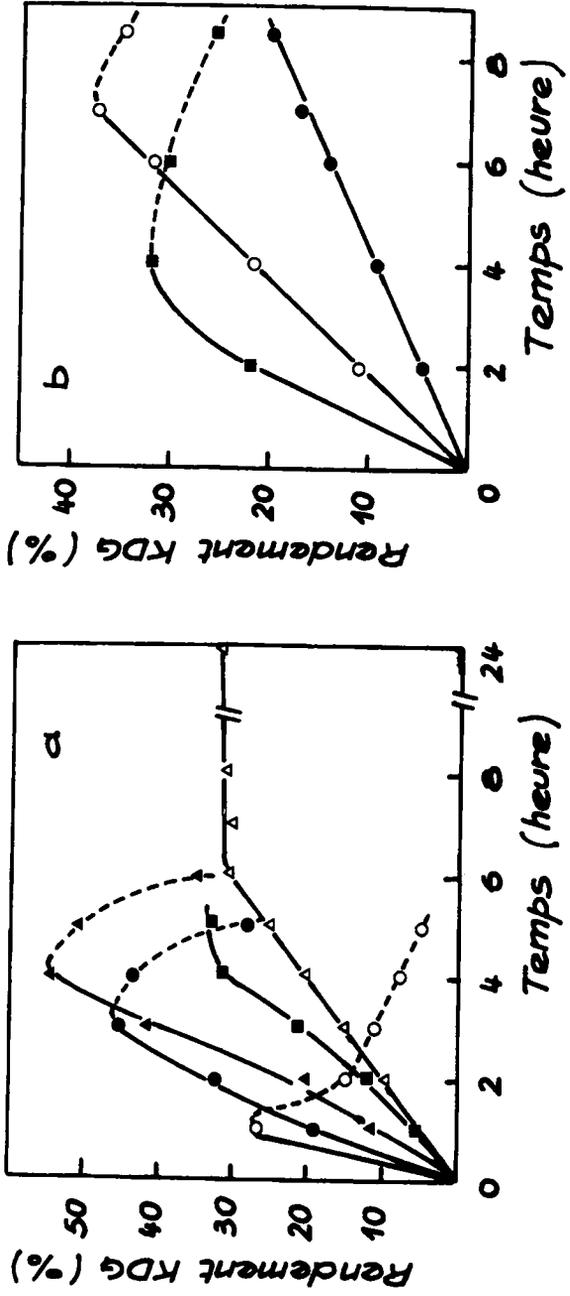


fig 2a, montre que le rendement est maximum pour une concentration de 4 mg/ml de gluconate. Ce maximum n'étant pas stable (utilisation du KDG par la voie secondaire), nous avons recherché les possibilités de production chez une souche dérivée de CAK 101 : X 51, portant une mutation encore non caractérisée pour l'étape de la voie secondaire (4). Si nous avons en effet pu noter la non-utilisation du KDG produit par cette souche après 24 h d'aération (Fig.2a), nous n'avons jamais pu atteindre le maximum de rendement observé avec CAK 101. La figure 2b indique une proportionnalité de la production du KDG en fonction de la masse bactérienne dans les débuts de la phase de production.

De ces études préliminaires, il semble ressortir que les meilleures conditions de production de KDG avec la souche CAK 101 sont réalisées avec une densité bactérienne de l'ordre de 10^9 cellules/ml, dans un milieu NaCl $10^{-2}M$, avec une forte aération et une concentration de gluconate comprise entre 3 et 4 mg/ml.

2- Protocole expérimental

a) -production du KDG- Une préculture de CAK 101 issue d'une croissance sur glycérol + gluconate est centrifugée puis remise en suspension dans 140 ml de NaCl $10^{-2}M$ + 30 ml de D-gluconate de potassium- $6-^{14}C$ 0,1 M dans NaCl (Activité spécifique = 0,2 Ci/mole). La densité bactérienne est voisine de 9.10^8 bactéries/ml. Cette suspension est agitée dans une fiole conique de 2l à 37°C. Nous avons observé un maximum de production après 6 h d'aération. Le rendement en KDG était de 32 % pour cette expérience. Le milieu cellulaire est par la suite centrifugé 15 min à 10.000 g environ ; le culot bactérien est lavé par un petit volume de NaCl de façon à extraire le KDG accumulé dans les cellules par la KDG-perméase. Le surnageant et le milieu de lavage sont réunis.

b) - purification du KDG radioactif- Dans une première étape nous avons utilisé la méthode biologique suivante pour l'enrichissement en KDG radioactif : la souche sauvage P4X, capable de métaboliser gluconate et fructuronate ne peut utiliser le KDG car la KDG-perméase chez cette souche n'est pas inductible par le gluconate (2,10).

Une culture de la souche P4X cultivée dans les mêmes conditions que CAK 101 (cf § matériel et méthodes) est récoltée en phase exponentielle, centrifugée et lavée par NaCl. Ces cellules sont agitées et aérées pendant 2 h 30 , à une densité bactérienne de $4,5.10^8$ cellules/ml, dans la solution de KDG radioactive. Alors que la quantité

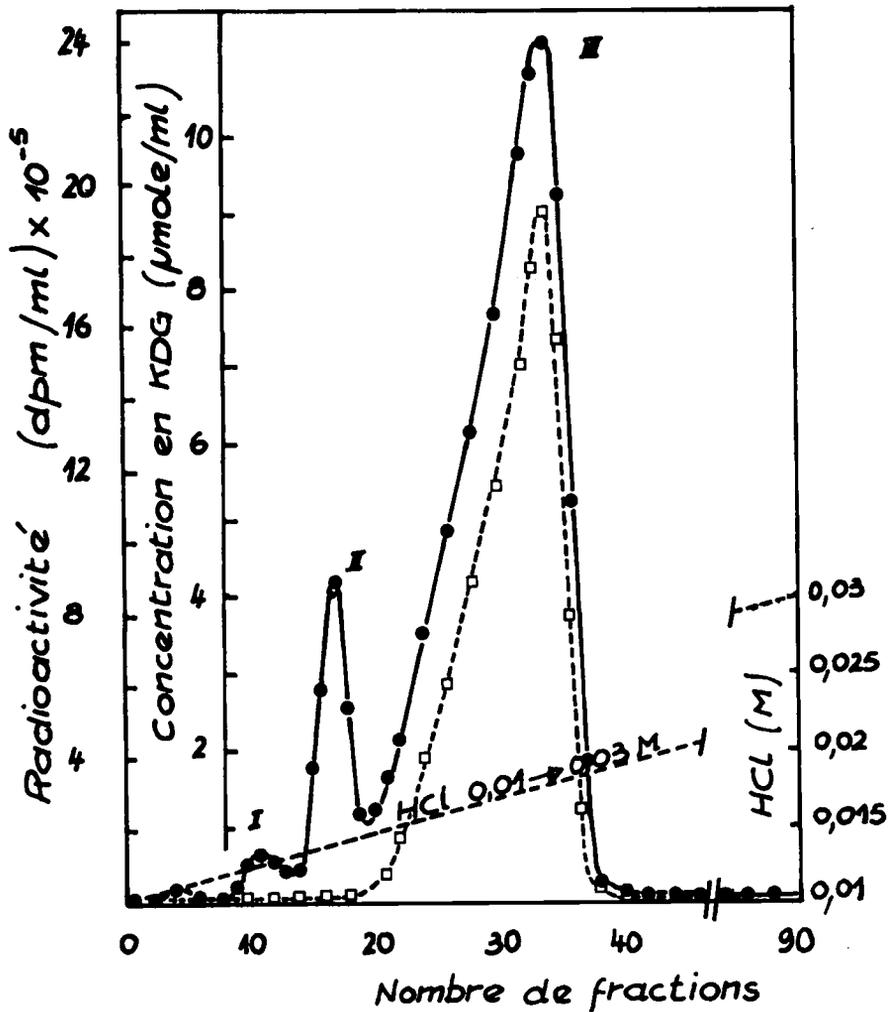
de KDG n'a pas varié, la radioactivité totale du milieu a diminué rapidement pendant la le heure puis s'est stabilisée après 2 h d'aération. La perte de radioactivité enregistrée est de 30 %. Cette perte résulte vraisemblablement de l'utilisation du glucuronate $-6-^{14}\text{C}$ non transformé et éventuellement du fructuronate formé par les cellules non proliférantes. Ces composés marqués sur le carbone 6 sont dégradés par la voie des hexuronates en pyrurate $-1-^{14}\text{C}$ (Fig.1) (1). Ce composé est ensuite rapidement décarboxylé ($^{14}\text{CO}_2$), expliquant la perte de radioactivité totale du milieu. Après centrifugation, le surnageant est désionisé en bain sur une résine cationique Dowex 50-X8. Les filtrats des lavages et de la solution initiale réunis, sont neutralisés par NaOH. La solution est ensuite concentrée à 37°C sous vide jusqu'à un volume de 5 ml.

Une étude préliminaire de séparation chromatographique d'un mélange de glucuronate et de KDG nous a permis d'orienter les modalités de purification du KDG- $1-^{14}\text{C}$ ou U- ^{14}C . Cette étape de purification est représentée par la figure 3. Après adsorption des 5 ml de la solution à purifier sur la colonne de résine anionique Dowex 1- X 8, forme Cl^- , un gradient linéaire en HCl 0,01 N \rightarrow 0,03 N est appliqué. Le pic II correspond à une trace de glucuronate (caractéristique d'éluion comparable à celle de l'étude préliminaire non représentée ici). Le pic III bien séparé du glucuronate résiduel correspond au KDG- $1-^{14}\text{C}$. Une bonne preuve de l'homogénéité du KDG est apportée par la constance du rapport radioactivité/ concentration molaire du KDG (Fig.3). La réaction colorée employée pour le dosage du KDG est hautement spécifique des 3-désoxy-alduloseonates, donc du KDG. Le pic I n'a pas été identifié. Les fractions 21 à 38 incluses sont réunies puis concentrées sous vide pour l'élimination totale de HCl. Une neutralisation par KOH nous a permis de faire le sel de potassium du KDG et surtout d'hydrolyser la KDG-lactone formée dans les conditions de pH très acide de l'évaporation (la neutralisation fut suivie au pH-mètre pour s'assurer de l'hydrolyse totale de la forme lactonisée). Le rendement final du KDG- $1-^{14}\text{C}$ purifié (0,2 Ci/mole) est de 20 % par rapport au glucuronate de départ.

c) -Identification du composé obtenu-

L'identification de ce composé obtenu par voie microbiologique, au KDG authentique préparé enzymatiquement (8) repose sur les faits suivants : 1) Le composé excrété par un mutant kinase⁻ est positif à la réaction colorée de Waravdekar et Saslaw (6), 2) Il est substrat d'un extrait purifié de KDG-kinase, enzyme hautement spécifique (11), 3) Le Rf de ce composé en chromatographie ascendante sur couche minc

Figure : 3



est identique à celui du KDG authentique co-chromatographié ($R_f = 0,67$), 4) La chromatographie sur résine anionique d'un mélange de KDG radioactif issu de la préparation citée (expérience préliminaire), a fourni un profil de radioactivité superposable à celui du dosage chimique du KDG- ^{12}C témoin. (absorption à 549 nm du chromogène formé).

Ce procédé préparatif du KDG purifié a pu être utilisé pour la synthèse du KDG U- ^{14}C à partir du glucuronate U- ^{14}C commercialisé. Le composé a été obtenu avec un rendement identique à celui décrit et avec une activité spécifique de 0,9 Ci/mole. Cependant nous avons observé avec des activités spécifiques 20 fois plus élevées (0,1 mCi/ml) une nette baisse de la vitesse de production du KDG et un rendement maximum de l'ordre de 10 à 15 %. La présence éventuelle d'un inhibiteur de l'une des étapes enzymatiques, dans le glucuronate radioactif utilisé, paraît peu probable d'une part, par le fait que cette baisse de production est observée avec les 2 types de glucuronate U- ^{14}C et 6- ^{14}C synthétisés selon 2 voies bien différentes et d'autre part, par le fait que le glucuronate utilisé à la même activité spécifique (0,1 mCi/ml) après purification sur résine anionique présente le même phénomène (activité métabolique du glucuronate réduite). Bien que l'activité de 0,1 mCi/ml ne soit pas très élevée, il faudrait tout de même admettre un effet des radiations sur l'une des étapes nécessaires au métabolisme du glucuronate par les cellules non proliférantes.

En conclusion, cette méthode préparative du KDG -1 ou U- ^{14}C à l'avantage d'être très rapide et de se prêter à une bonne purification du composé excrété par les cellules. Néanmoins, pour la préparation de quantités beaucoup plus importantes la méthode de synthèse enzymatique du KDG- ^{12}C à partir du D-altronate que nous avons récemment décrite (8), bien que plus longue à mettre en oeuvre, présente d'un autre côté l'avantage de nécessiter une matière première radioactive moins coûteuse. En effet, le D-altronate -1- ^{14}C peut être synthétisé avec un excellent rendement à partir du D-ribose et de $^{14}\text{CN}^-$ (12).

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier Mlle Gisèle Montagné qui au cours d'un stage dans ce laboratoire a excellemment collaboré à la réalisation de ce travail.

Je voudrais également exprimer toute ma gratitude au professeur F. Stoeber pour l'intérêt constant qu'il a manifesté au cours de cette étude.

Ce travail a bénéficié de l'aide de la Délégation Générale à la Recherche Scientifique et Technique (Biologie moléculaire) et du Centre National de la Recherche Scientifique (Equipe de recherche associée n° 177).

REFERENCES

- 1- Ashwell, G. - in : S.P. Colowick et Kaplan, N.O., Methods in Enzymology, Academic Press, New York, 5 : 190 (1962).
- 2- Pouysségur, J. et Stoeber, F. - C.R. Acad. Sci. (Paris), 274 : 2249 (1972).
- 3- Pouysségur, J. et Lagarde, A. - Molec. Gen. Genetics, soumis à publication.
- 4- Pouysségur, J., Lagarde, A. et Stoeber, F., résultats inédits.
- 5- Siström, W.R. - Biochim. Biophys. Acta, 29 : 579 (1958).
- 6- Waravdekar, V.S. et Saslaw, L.D. - Biochim. Biophys. Acta, 24 : 439 (1957).
- 7- Weissbach, A. et Hurwitz, J. - J. Biol. Chem., 234 : 705 (1959).
- 8- Pouysségur, J. et Stoeber, F. - Bull. Soc. Chim. Biol., 52 : 1419 (1970).
- 9- Dawson, R.M.C., Elliot-Daphne, C., Elliot, W.H., Jones, K.M. - Data for biochemical Research, Oxford at the Clarendon Press, p.548 (1969).
- 10- Lagarde, A., Pouysségur, J. et Stoeber, F. - Febs letters (sous presse).
- 11- Pouysségur, J. et Stoeber, F. - Biochimie, 53 : 771 (1971).
- 12- Pratt, J.W. et Richtmyer, N.K. - J. Am. Chem. Soc., 77 : 1906 (1955).